

*** NOTICES ***

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2.**** shows the word which can not be translated.

3.In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1]

A duplicate of a human immunodeficiency virus (HIV). Double strand short interference nucleic acid to check. (siNA) Are a molecule, one chain of said double strand siNA molecule is an antisense strand including a nucleotide sequence of HIV RNA, or a nucleotide sequence complementary to the part, and a chain of another side a nucleotide sequence complementary to a nucleotide sequence of an antisense strand. A siNA molecule which is an included sense strand and is characterized by most pyrimidine nucleotides which exist in said double strand siNA molecule including sugar ornamentation.

[Claim 2]

The siNA molecule according to claim 1 in which HIV RNA contains HIV-1 RNA.

[Claim 3]

The siNA molecule according to claim 1 in which HIV RNA contains HIV-2 RNA.

[Claim 4]

The siNA molecule according to claim 1 in which a siNA molecule does not contain ribonucleotide.

[Claim 5]

The siNA molecule according to claim 1 in which a siNA molecule contains ribonucleotide.

[Claim 6]

The siNA molecule according to claim 1 in which all the pyrimidine nucleotides in a siNA molecule include sugar ornamentation.

[Claim 7]

An embellished pyrimidine nucleotide 2'-deoxy pyrimidine, 2'-O-alkyl pyrimidine, 2'-C-alkyl pyrimidine, 2'-deoxy 2'-fluoro-pyrimidine, 2'-aminopyrimidine, 2'-methoxy-ethoxypyrimidine, And the siNA molecule according to claim 6 chosen from independent or arbitrary combination of a 2'-O,4'-C-methylene pyrimidine nucleotide.

[Claim 8]

The siNA molecule according to claim 7 whose 2'-O-alkyl pyrimidine nucleotide is 2'-O-methyl or 2'-O-allyl.

[Claim 9]

The siNA molecule according to claim 1 complementary to RNA which encodes HIV protein or its fragmentation in a nucleotide sequence of an antisense strand of a double strand siNA molecule.

[Claim 10]

The siNA molecule according to claim 1 complementary [chain / of a siNA molecule / each / including about 19 to about 29 nucleotides] to a nucleotide of a chain of another side in each chain which contains about 19 nucleotides at least.

[Claim 11]

The siNA molecule according to claim 1 in which said siNA molecule is assembled from two oligonucleotide fragmentation, one fragmentation includes a nucleotide sequence of an antisense strand of a siNA molecule, and the 2nd fragmentation includes a nucleotide sequence of a sense strand of a siNA molecule.

[Claim 12]

The siNA molecule according to claim 1 by which a sense strand is connected with an antisense strand via a linker molecule.

[Claim 13]

The siNA molecule according to claim 12 in which said linker molecule is a polynucleotide linker.

[Claim 14]

The siNA molecule according to claim 12 in which said linker molecule is a non-nucleotide linker.

[Claim 15]

The siNA molecule according to claim 1 whose arbitrary pyrimidine nucleotides which exist in a sense strand are 2'-deoxy 2'-fluoro pyrimidine nucleotides and whose arbitrary purine nucleotides which exist in a sense field are 2'-deoxy purine nucleotides.

[Claim 16]

The siNA molecule according to claim 1 to which an end cap ingredient exists including a three-dash terminal and a five prime end in both a five prime end of said sense strand, a three-dash terminal or a five prime end, and a three-dash terminal in a sense strand.

[Claim 17]

The siNA molecule according to claim 16 in which said end cap ingredient is a part for reversal deoxy salt-free Motonari.

[Claim 18]

The siNA molecule according to claim 1 in which an antisense strand contains 1 or a 2'-deoxy 2'-fluoro pyrimidine nucleotide beyond it and 1, or a 2'-O-methyl purine nucleotide beyond it.

[Claim 19]

The siNA molecule according to claim 1 whose arbitrary pyrimidine nucleotides which exist in an antisense strand are 2'-deoxy 2'-fluoro pyrimidine nucleotides and whose arbitrary purine nucleotides which exist in an antisense strand are 2'-O-methyl purine nucleotides.

[Claim 20]

The siNA molecule according to claim 1 to which an antisense strand includes combination between phosphorothioate nucleotides in a three-dash terminal of said antisense strand.

[Claim 21]

The siNA molecule according to claim 1 to which an antisense strand includes glyceryl ornamentation in a three-dash terminal of said antisense strand.

[Claim 22]

The siNA molecule according to claim 1 in which each chain of a siNA molecule contains 21 nucleotides.

[Claim 23]

The siNA molecule according to claim 22 in which about 19 nucleotides of each chain of a siNA molecule carry out base pair formation to a complementary nucleotide of a chain of another side of a siNA molecule, and at least two three-dash terminal nucleotides of each chain of a siNA molecule do not carry out base pair formation to a nucleotide of a chain of another side of a siNA molecule.

[Claim 24]

The siNA molecule according to claim 23 whose two three-dash terminal nucleotides of each fragmentation of a siNA molecule are 2'-deoxy pyrimidines.

[Claim 25]

The siNA molecule according to claim 24 whose 2'-deoxy pyrimidine is 2'-deoxy thymidine.

[Claim 26]

The siNA molecule according to claim 22 in which 21 nucleotides of each chain of a siNA molecule carry out base pair formation to a complementary nucleotide of a chain of another side of a siNA molecule.

[Claim 27]

The siNA molecule according to claim 22 in which about 19 nucleotides of an antisense strand carry out base pair formation to a nucleotide sequence of HIV RNA, or its part.

[Claim 28]

The siNA molecule according to claim 22 in which 21 nucleotides of an antisense strand carry

out base pair formation to a nucleotide sequence of HIV RNA, or its part.

[Claim 29]

The siNA molecule according to claim 1 in which a five prime end of an antisense strand may contain a phosphate group arbitrarily.

[Claim 30]

The siNA molecule according to claim 1 complementary to a nucleotide sequence of a 5'-untranslation region of HIV RNA, or its part in a nucleotide sequence of an antisense strand, or its part.

[Claim 31]

The siNA molecule according to claim 1 complementary to a nucleotide sequence of HIV RNA which exists in RNA of all the HIV(s), or its part in a nucleotide sequence of an antisense strand, or its part.

[Claim 32]

A medicinal composition which contains the siNA molecule according to claim 1 in a carrier which can be permitted, or a diluent.

[Claim 33]

Drugs containing the siNA molecule according to claim 1.

[Claim 34]

An active ingredient containing the siNA molecule according to claim 1.

[Claim 35]

Are a duplicate of a human immunodeficiency virus (HIV) use of a double strand short interference nucleic acid (siNA) molecule to check, and here, One side of a chain of a double strand siNA molecule HIV. A nucleotide sequence of RNA. Or a nucleotide sequence complementary to the part. Use which it is an included antisense strand, and a chain of another side is a sense strand which includes a complementary nucleotide sequence in a nucleotide sequence of an antisense strand, and is characterized by most pyrimidine nucleotides which exist in a double strand siNA molecule including sugar ornamentation.

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公報(A) 特許公表

(11) 特許出版公報

特表2006-50269-4

(43) 公表日 平成18年1月26日(2006.1.26)

(51) Int. Cl.	F 1	ターコト (参考)
C 12 N 15/00	C 12 N 15/00	4B024
A61 K 31/705	A61 K 31/705	4C086
A61 P 31/18	A61 P 31/18	
(2006.07)		
(2006.07)		
(2006.07)		

(21) 出版番号	特選2003-569155 (P2003-569155)	(71) 出願人	500203684
(86) (22) 出願日	平成15年9月20日 (2003. 2. 20)		サエチ・セラピューティクス・インコーポ レーテッド
(93) 審判文書提出日	平成16年3月16日 (2004. 8. 16)		レイ・フット
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/005190		Sirina Therapeutics, Inc.
(87) 国際公報番号	WO2003/070193		アメリカ合衆国コロラド州80301, ホ ウルダー, ウィルダナー・フレイス 2 9 50
(87) 国際公報日	平成15年9月25日 (2003. 8. 28)		
(31) 優先権主張番号	60/355, 580.	(74) 代理人	弁理士 大野 聖二
(32) 優先日	平成14年2月20日 (2002. 2. 20)		弁理士 420104019
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	弁理士 森田 耕司
(31) 優先権主張番号	60/365, 124		弁理士 100106840
(32) 優先日	平成14年3月11日 (2002. 3. 11)	(74) 代理人	弁理士 深田 耕司
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	弁理士 100105391
(31) 優先権主張番号	60/374, 722		弁理士 田中 博子
(32) 優先日	平成14年4月23日 (2002. 4. 23)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 126 頁)

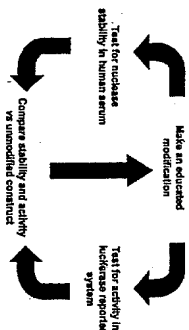
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 短干渉核酸 (s i n A) を用いるH I V 遺伝子発現のRNA干渉媒介性阻害

最終頁に続く

(57) 【要約】

本発明は、種々の用途、例えば、治療、診断、標的評価、おびびゲノム発見用途における使用において、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）の遺伝子表現を抑制するに有効な方法および試薬に関する。詳細には、本発明は、HIV遺伝子の発現および/または活性に対するRNA干渉（RNAi）を媒介しうる小核酸分子、例えば、短干渉核酸（siRNA）、短干渉RNA（siRNA）、二本鎖RNA（dsRNA）、ペナクロRNA（miRNA）本鎖RNA（dsRNA）、ペナクロRNA（miRNA）を含む、および短ヘアピンRNA（shRNA）分子に関する。小核酸分子は、HIV感染、AIDS、およびHIV感染のIVの発症または活性の調節に反応する他の宿主の発症または病気の治療において有用である。



【特許請求の範囲】

ヒト免疫不全ウイルス (HIV) の複製を阻害する二本鎖短干渉核酸 (siRNA) 分子は、あらかじめ、前記二本鎖 siRNA 分子の一方の鎖は HIV-RNA のヌクレオチド配列またはその一部に相補的なヌクレオチド配列を含むアプタゼンヌ鎖であり、他方の鎖はアプタゼンヌ鎖のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含むセレンヌ鎖であり、前記二本鎖 siRNA 分子中に存在するヒンジヌクレオチドの大部分は糖修飾を含むことを特徴とする siRNA 分子。

HIV RNAがHIV-1 RNAを含む、請求項1記載のsRNA分子。

HIV RNAがHIV-2 RNAを含む，請求項1記載のs i N A分子。

【請求項4】

【請求項5】

SINA分子がリボヌクレオチドを含む，請求項1記載のSINA分子。

S i N A 分子中のすべてのトリミジヌクレオチドが糖修飾を含む，請求項1記載の S i N A 分子。

【請求項7】

修飾されたトリミジンヌクレオチドが、2'-デオキシ-トリミジン、2'-O-アルカルビリミジン、2'-C-アルカルビリミジン、2'-デオキシ-2'-フルオロ-トリミジン、2'-アミノトリミジン、2'-メトキシ-エトキシトリミジン、および2',4'-C-メチルトリミジンヌクレオチドの単量または任意の組み合わせから選択される、請求項6記載のsINA分子。

2'- α -アルキルピリミジンヌクレオチドが2'- α -メチルまたは2'- α -アリルである，請求項7記載のsINA分子。

ニ本鎖 sRNA 分子のアンチセンス鎖のヌクレオチド配列が、HIV 蛋白質またはそのフラグメントをコードする RNA に相補的である、請求項 1 記載の sRNA 分子。

sinA分子の各鎖が約19—約29ヌクレオチドを含み、各鎖が他方のヌクレオチドに相補的な少なくとも約19ヌクレオチドを含む、請求項1記載のsinA分子。

前記 SiNA 分子が2つのオリゴヌクレオチドブランチメントから組み立てられ、一方のブランチメントは SiNA 分子のアリチン銀のヌクレオチド配列を含み、第2のブランチメントは SiNA 分子のセンス鎖のヌクレオチド配列を含む、請求項1記載の SiNA 分子

【請求項12】
センス鎖がリソカー分子を介してアナンセスンス鎖と連結されている、請求項1記載のs1
NA分子。

【請求項13】
前記リソカー分子がポリヌクレオチドリンカーである、請求項12記載のs i N A分子。

【請求項14】
前記リソカー分子が非ヌクレオチドリソカーである。請求項12記載のs i N A分子。

【請求項 15】

センス鎖に存在する任意のポリミジンスクアレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロポリミジンスクアレオチドであり、センス領域に存在する任意のポリミジンスクアレオチドが2'-デオキシポリミジンスクアレオチドである。請求項1記載のSINA分子。

【請求項16】 3'末端および5'末端を含み、前記センス鎖の5'末端、3'末端、または5'末端および3'末端の両方に末端キヤップ成分が存在する、請求項1記載のs i n A分子。

【請求項17】

前記末端キヤップ成分が反転デオキシ無塩基成分である、請求項16記載のs i n A分子。

【請求項18】

アンチセンス鎖が、1またはそれ以上の2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドおよび1またはそれ以上の2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドを含む、請求項1記載のs i n A分子。

【請求項19】

アンチセンス鎖に存在する任意のピリミジンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであり、アンチセンス鎖に存在する任意のプリンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドである、請求項1記載のs i n A分子。

【請求項20】

アンチセンス鎖が前記アンチセンス鎖の3'末端にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む、請求項1記載のs i n A分子。

【請求項21】

アンチセンス鎖が前記アンチセンス鎖の3'末端にグリセリル修飾を含む、請求項1記載のs i n A分子。

【請求項22】

s i n A分子の各鎖が21ヌクレオチドを含む、請求項1記載のs i n A分子。

【請求項23】

s i n A分子の各鎖の約19ヌクレオチドがs i n A分子の他方の鎖の相補的ヌクレオチドと塩基対形成し、s i n A分子の各鎖の少なくとも2つの3'末端ヌクレオチドがs i n A分子の他方の鎖のヌクレオチドと塩基対形成しない、請求項22記載のs i n A分子。

【請求項24】

s i n A分子の各フラグメントの2つの3'末端ヌクレオチドが2'-デオキシ-ピリミジンである、請求項23記載のs i n A分子。

【請求項25】

2'-デオキシ-ピリミジンが2'-デオキシ-チミジンである、請求項24記載のs i n A分子。

【請求項26】

s i n A分子の各鎖の21ヌクレオチドがs i n A分子の他方の鎖の相補的ヌクレオチドと塩基対形成する、請求項22記載のs i n A分子。

【請求項27】

アンチセンス鎖の約19ヌクレオチドがH i V RNAのヌクレオチド配列またはその一部と塩基対形成する、請求項22記載のs i n A分子。

【請求項28】

アンチセンス鎖の21ヌクレオチドがH i V RNAのヌクレオチド配列またはその一部と塩基対形成する、請求項22記載のs i n A分子。

【請求項29】

アンチセンス鎖の5'末端が任意にリン酸基を含んでもよい、請求項1記載のs i n A分子。

【請求項30】

アンチセンス鎖のヌクレオチド配列またはその一部がH i V RNAの5'-非翻訳領域のヌクレオチド配列またはその一部に相補的である、請求項1記載のs i n A分子。

50

アンチセンス鎖のヌクレオチド配列またはその一部が、すべてのH i VのRNA中に存在するH i V RNAのヌクレオチド配列またはその一部に相補的である、請求項1記載のs i n A分子。

【請求項32】

許容しうる担体または希釈剤中に請求項1記載のs i n A分子を含む、医薬組成物。

【請求項33】

請求項1記載のs i n A分子を含む医薬品。

【請求項34】

請求項1記載のs i n A分子を含む活性成分。

【請求項35】

ヒト免疫不全ウイルス(H i V)の複製を阻害する二本鎖短干渉核酸(s i n A)分子の使用であって、ここで、二本鎖s i n A分子の鎖の一方はH i V RNAのヌクレオチド配列またはその一部に相補的なヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖であり、他方の鎖はアンチセンス鎖のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含むセンス鎖であり、二本鎖s i n A分子中に存在するピリミジンヌクレオチドの大部分が糖修飾を含むことを特徴とする使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、McSwi ggen, 米国特許出願60/398, 036 (2002年7月23日出願), McSwi ggen, 米国特許出願10/225, 023 (2002年8月21日出願), McSwi ggen, 米国特許出願60/294, 140 (2001年5月29日出願) に基づく優先権を主張するMcSwi ggen, 米国特許出願10/157, 580 (2002年5月29日出願), McSwi ggen, 米国特許出願60/374, 722 (2002年4月22日出願), Beigelman, 米国特許出願60/358, 580 (2002年2月20日出願), Beigelman, 米国特許出願60/363, 124 (2002年3月11日出願), Beigelman, 米国特許出願60/386, 782 (2002年6月6日出願), Beigelman, 米国特許出願60/406, 784 (2002年8月29日出願), Beigelman, 米国特許出願60/408, 378 (2002年9月5日出願), Beigelman, 米国特許出願60/409, 293 (2002年9月9日出願), およびBeigelman, 米国特許出願60/440, 129 (2003年1月15日出願) に基づく優先権を主張する。これらの出願は、図面を含めその全体を本明細書の一部としてここに引用する。

【0002】

本発明は、ヒト免疫不全ウイルス(H i V)の遺伝子発現および/または活性の調節に応答する健康状態および疾病の研究、診断、および治療のための化合物、組成物、および方法に関する。本発明はまた、ヒト免疫不全ウイルス(H i V)の発現および活性の経路に関与する遺伝子の発現および/または活性の調節に応答する健康状態および疾病に関連する化合物、組成物、および方法に関する。特に、本発明は、H i Vの遺伝子発現に対するRNA干渉(RNA i)を媒介しうる小核酸分子、例えば短干渉核酸(s i n A)、短干渉RNA(s i r n A)、二本鎖RNA(dsRNA)、マイクロRNA(miRNA)、および短ヘアピンRNA(shRNA)分子に関連する。

【背景技術】

【0003】

以下はRNA iに関連する関連技術の説明である。この説明は、以下に記載される本発明を理解するためにのみ提供される。この概要は、以下に記載される研究のいずれかが本発明に対する先行技術であると認めるものではない。

【0004】

RNA干渉とは、動物において短干渉RNA(s i r n A)により媒介される配列特異

5

的転写後遺伝子サイレンシングのプロセスを表す (Fire et al., 1998, Nature, 391, 806)。植物における対応するプロセスは一般に転写後遺伝子サイレンシングまたはRNAサイレンシングと称され、真菌においてはクエンチタとも称される。転写後遺伝子サイレンシングのプロセスは、外来遺伝子の発現を防止するために用いられる進化的に保存された細胞防御メカニズムであると考えられており、異なる機および門が共通して有している (Fire et al., 1999, Trends Genet., 15, 358)。そのような外来遺伝子発現からの防御は、ウイルス感染または宿主ゲノム中へのトランスポゾン要素のランダムインジェクションから生ずる二本鎖RNA (dsRNA) の生成にตอบสนองして、相同的二本鎖RNAまたはウイルスゲノムRNAを特異的に破壊する細胞応答により進化したものである。細胞におけるdsRNAの存在は、まだ完全には特性決定されていないメカニズムにより、RNAi応答を引き起こす。このメカニズムは、蛋白質キナーゼPKRおよび2', 5'-オリゴアデニレートシセンスのdsRNA媒介性活性化の結果リボヌクレアーゼIIによるmRNAの非特異的切断が生ずるインターフェロン応答とは異なるようである。

[00051]

細胞中に長いdsRNAが存在すると、ダイサーと称されるリボヌクレアーゼII酵素の活性が刺激される。ダイサーは、dsRNAをプロセッシングして短干渉RNA (siRNA) として知られる短い断片のdsRNAにすることに関与している (Bernstein et al., 2001, Nature, 409, 363)。ダイサー活性から生ずる短干渉RNAは、典型的には約21-23ヌクレオチドの長さであり、約19塩基対のデュアルストラックを含む (Elbashir et al., 2001, Genes Dev., 15, 188)。ダイサーはまた、翻訳制御における関与が示唆されている保存された構造の前駆体RNAから21および22ヌクレオチドの小さな一時的RNA (sRNA) を切り出すことに関与することが示唆されている (Hutvagner et al., 2001, Science, 293, 834)。RNAi応答はまた、一般にRNA誘導性サイレンシング複合体 (RISC) と称されるエンボヌクレアーゼ複合体を特徴とし、これはsiRNAデュアルストラックのアンチセンス鎖に相補的な配列を有する一本鎖RNAの切断を媒介する。機能的RNAの切断は、siRNAデュアルストラックのアンチセンス鎖に相補的な領域の中央部で生ずる (Elbashir et al., 2001, Genes Dev., 15, 188)。

[00061]

RNAiは種々の系で研究されてきた。Fireら (1998, Nature, 391, 806) は、C. Elegansにおいて最初にRNAiを観察した。WianneyおよびGoeltz (1999, Nature Cell Biol., 2, 70) は、マウス胚においてdsRNAにより媒介されるRNAiを記載する。Hammondsら (2000, Nature, 404, 293) は、dsRNAでトランスフェクトしたショウジョウバエ細胞におけるRNAiを記載する。Elbashirら (2001, Nature, 411, 494) は、培養哺乳動物細胞、例えばヒト胚性腎臓細胞およびHeLa細胞において、合成の21ヌクレオチドRNAのデュアルストラックを導入することにより誘導されるRNAiを記載する。ショウジョウバエ胚性細胞における最近の研究 (Elbashir et al., 2001, EMBO J., 20, 6877) は、効率的なRNAi活性を媒介するために必須であるsiRNAの長さ、構造、化学組成、および配列についてのある種の要件を明らかにした。これらの研究は、21ヌクレオチドのsiRNAデュアルストラックは3'末端ジュクシオチドオーバーハングを含む場合に最も活性であることを示した。さらに、一方または両方のsiRNA鎖を2'-デオキシ (2'-H) または2'-オースチルヌクレオチドで置換するとRNAi活性が破壊されるが、3'末端siRNAオーバーハングヌクレオチドを2'-デオキシヌクレオチド (2'-H) で置換することは許容されることが示された。siRNAデュアルストラックの中心における単一のミスマッチ配列もまたRNAi活性を破壊することが示された。さらに、これらの研究はまた、機能的RNAにおける切断部位の位置はsiRNAガイド配列の3'末端ではな

くガイド配列の5'末端により規定されることを示した (Elbashir et al., 2001, EMBO J., 20, 6877)。他の研究は、siRNAデュアルストラックの機能的相補鎖の5'-リン酸がsiRNA活性に必要であり、siRNAの5'-リン酸成分を維持するためにATPが用いられることを示した (Nykanen et al., 2001, Cell, 107, 309)。

[00071]

2ヌクレオチドの3'-オーバーハングを有する21-merのsiRNAデュアルストラックの3'末端ヌクレオチドのオーバーハングしているセグメントをデオキシリボヌクレオチドで置き換えても、RNAi活性に有害な影響を有しないことが示されている。siRNAの各末端で4個までのヌクレオチドをデオキシリボヌクレオチドで置き換えることはよく許容されたと報告されているが、デオキシリボヌクレオチドで完全に置換するとRNAi活性がなくなる (Elbashir et al., 2001, EMBO J., 20, 6877)。さらに、Elbashirら (上掲) はまた、siRNAを2'-オースチルヌクレオチドで置換すると、RNAi活性が完全に破壊されたことを報告する。Lira (国際公開WO00/44914) およびBeachら (国際公開WO01/6836) は、siRNAがリソソーム様構造またはヌクレオチドのいずれかに結合またはイオノ複素原子の少なくとも一つを含むよう修飾することができるとを予備的に示唆する。しかし、いずれの出願も、siRNA分子においてそのような修飾がどの程度許容されるかを仮定しておらず、そのような修飾siRNAのそれ以上の指針または実例を提供していない。Kreutzersら (カナダ特許出願2,359,180) もまた、dsRNAコンストラクトにおいて二本鎖RNA依存性蛋白質キナーゼPKRの活性化を妨げる目的で用いるためのある種の化学的修飾、特に2'-アミノまたは2'-オースチルヌクレオチド、および2'-Oまたは4'-Cメチレン架橋を含むヌクレオチドを記載する。しかし、Kreutzersらも同様に、siRNA分子においてこれらの修飾がどの程度許容されるかについての実例または指針を提供していない。

[00081]

Parishら (2000, Molecular Cell, 6, 1977-1087) は、C. elegansにおいて長い (>25nt) siRNA転写産物を用いてunc-22遺伝子を標的とするある種の化学的修飾を試験した。著者らは、T7およびT3 RNAポリメラーゼによりチオリン酸ヌクレオチド類似体を取り込まれることによりこれらのsiRNA転写産物中にチオリン酸修飾を導入すること、および2個のホスホロチオエーテル修飾導入を有するRNAもRNAiとしての有効性を実質的に低下させたことを記載する。さらに、Parishらは、2残基より多いホスホロチオエーテル修飾は、干渉活性をアッセイすることができないほど大きくインビトロでRNA転写産物中のヌクレオチド残の2'位におけるある種の修飾を試験して、リボヌクレオチドをデオキシヌクレオチドで置換すると、特にウリジンからチミジンおよび/またはシチジンからデオキシシチジンへの置換の場合に、干渉活性が実質的に減少することを見いだした (同上)。さらに、著者らは、ある種の塩基修飾、例えば、siRNAのセンス鎖およびアンチセンス鎖において、ウラシルの代わりに4-チオウラシル、5-ブROMウラシル、5-ヨードウラシル、および3-(7-メチル)ウラシル、およびグアニンの代わりにイノシンの置換を試験した。4-チオウラシルおよび5-ブROMウラシル置換は許容されたように見えたが、Parishは、イノシンはいずれの鎖に取り込まれたときにも干渉活性における実質的な減少を生じたことを報告している。Parishはまた、アンチセンス鎖における5-ヨードウラシルおよび3-(7-メチル)ウラシルの取り込みによっても、RNAi活性が実質的に減少したことを報告している。

[00091]

より長いdsRNAの使用が記載されている。例えば、Beachら (国際公開WO01/68836) は、内因性dsRNAを用いて遺伝子発現を弱めるための特定の方法を記載する。Tuschliら (国際公開WO01/75164) は、ショウジョウバエのイ

シトクロムRNAiシステム、およびある種の機能的な用途およびある種の治療用途に特定のsiRNA分子を用いることを記載する。しかし、Tuschli (2001, Chem. Biochem., 2, 239-245) は、インターフェロン応答の活性性の危険性のため、遺伝的疾患またはウイルス感染を治療するためにRNAiを用いることができることは疑わしいと述べている。Lira (国際公開WO00/44914) は、ある種の遺伝子の発現を弱めるために特定のdsRNAを用いることを記載する。Zernicka-Goetzら (国際公開WO01/36646) は、ある種のdsRNA分子を用いて哺乳動物細胞において特定の遺伝子の発現を阻害するある種のの方法を記載する。Fireら (国際公開WO99/32619) は、遺伝子発現の阻害に用いるためにある種のdsRNA分子を細胞内に導入するための特定のの方法を記載する。Piaellinckら (国際公開WO00/01846) は、特定のdsRNA分子を用いて細胞において特定の表現型を与える原因である特定の遺伝子を同定するある種のの方法を記載する。Mellorら (国際公開WO01/29058) は、dsRNA媒介性RNAiに關与する特定の遺伝子の同定を記載する。Deschamps Depailliettesら (国際公開WO99/07409) は、ある種の抗ウイルス剤と組み合わせた特定のdsRNA分子からなる特定の組成物を記載する。Waterhouseら (国際公開99/53050) は、ある種のdsRNAを用いて植物細胞における核糖体の発現を減少させるある種のの方法を記載する。Driscollら (国際公開WO01/49844) は、標的の生物において遺伝子サイレンシングを促進するのに用いるための特定のDNAコンストラクトを記載する。

[0010]

他の者は、種々のRNAiおよび遺伝子サイレンシングシステムを報告している。例えば、Parishら (2000, Molecular Cell, 6, 1977-1087) は、C. elegansのunc-22遺伝子を標的とする特定の化学的に修飾されたsiRNAコンストラクトを記載する。Grossniklaus (国際公開WO01/38551) は、植物においてある種のdsRNAを用いてポテトコムシ遺伝子発現を制御するためのある種のの方法を記載する。Churikovら (国際公開WO01/42443) は、ある種のdsRNAを用いて生物の遺伝的特性を改変するある種のの方法を記載する。Cognigniら (国際公開WO01/53475) は、Neurosporaのサイレンシング遺伝子を単離するある種のの方法およびその用途を記載する。Reedら (国際公開WO01/68836) は、植物における遺伝子サイレンシングのある種のの方法を記載する。Honerer (国際公開WO01/70944) は、ある種のdsRNAを用いてパーキンソン病のモデルとしてトランスジェニック線虫を用いる薬剤スクリーニングのある種のの方法を記載する。Deakら (国際公開WO01/72774) は、ショウジョウバエにおけるRNAiに關連するかもしれないある種ののショウジョウバエ由来遺伝子産物を記載する。Arndtら (国際公開WO01/92513) は、RNAiを増強する因子を用いて遺伝子抑制を媒介するある種のの方法を記載する。Tuschliら (国際公開WO02/44321) は、ある種の合成siRNAコンストラクトを記載する。Pachukら (国際公開WO00/63364) およびSatishchandranら (国際公開WO01/04313) は、ある種のdsRNAを用いてある種ののポリヌクレオチド配列の機能を阻害するためのある種のの方法および組成物を記載する。Echeverriら (国際公開WO02/38805) は、RNAiにより同定されたある種ののC. elegans遺伝子を記載する。Kreutzera (国際公開WO02/055692, WO02/055693, およびEP144623B1) は、RNAiを用いて遺伝子発現を阻害するある種のの方法を記載する。Grahamら (国際公開WO99/49029 およびWO01/70949, およびAU4037501) は、ベクターから発現されるある種ののsiRNA分子を記載する。Fireら (US6, 559) は、RNAiを媒介するある種ののdsRNA (25ヌクレオチドより長い) を用いてイントロで遺伝子発現を阻害するためのある種のの方法を記載する。

[0011]

後天性免疫不全症候群(AIDS)は、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)の感染により引き起こされると考えられている。Draperら(米国特許6,159,692,5,972,704,5,693,535,および国際公開WO93/23569およびWO95/04818)は、HIVを標的とする糖基的核糖分子を記載する。Novinaら(2002, Nature Medicine, 8, 681-686)は、HIV-1感染を標的とするある種ののsiRNAコンストラクトを記載する。Leeら(2002, Nature Biotechnology, 19, 500-505)は、HIV-1を標的とするある種ののsiRNAを記載する。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0012】

発明の概要

本発明は、短干渉核糖酸(sRNA)分子を用いてRNA干渉(RNAi)により、遺伝子、例えば、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染、および後天性免疫不全症候群(AIDS)の発現または維持に關連する遺伝子の発現を調節するのに有用な化合物、組成物および方法に關する。本発明はまた、小核糖分子、例えば、短干渉核糖酸(sRNA)、短干渉RNA(sRNA)、二本鎖RNA(dsRNA)、マイクロRNA(miRNA)および短ヘブロンRNA(shRNA)分子を用いて、RNA干渉(RNAi)により、HIV遺伝子、またはHIV経路に關与する遺伝子またはHIV活性に關与する遺伝子の発現および活性を調節するのに有用な化合物、組成物、および方法に關する。特に、本発明は、HIV遺伝子の発現を調節するのに用いられる小核糖分子、例えば、短干渉核糖酸(sRNA)、短干渉RNA(sRNA)、二本鎖RNA(dsRNA)、マイクロRNA(miRNA)、および短ヘブロンRNA(shRNA)分子および方法を提供する。本発明のsRNAは、修飾しなくてもよく、化学的に修飾してもよい。本発明は、化学的に合成してもよく、ベクターから発現させてもよく、酵素的に合成してもよい。本発明はまた、RNA干渉(RNAi)により細胞におけるHIV遺伝子の発現または活性を調節しうる種々の化学的に修飾された合成短干渉核糖酸(sRNA)分子を特徴とする。化学的に修飾されたsRNAを使用することにより、インビボでのヌクレアーゼ分解に対する前性の増加、および/または細胞取り込みの改良のため、天然のsRNA分子の種々の特性が改良される。さらに、初期に発現された研究に反して、多くの化学的修飾を有するsRNAは、そのRNAi活性を保持している。本発明のsRNA分子は、種々の治療、診断、標的評価、ゲノム発見、遺伝子工学、およびフエーゴゲノミクスに有用な試薬および方法を提供する。

【0013】

1つの態様においては、本発明は、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)の複製を阻害する二本鎖短干渉核糖酸(sRNA)分子を特徴とし、二本鎖sRNA分子の一方の鎖は、HIV RNAのヌクレオチド配列またはその一部に相補的なヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖であり、他方の鎖はアンチセンス鎖のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含むセンス鎖である。1つの態様においては、HIV RNAはHIV-1 RNAを含む。別の態様においては、HIV RNAはHIV-2 RNAを含む。

【0014】

1つの態様においては、本発明は、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)の複製を阻害する二本鎖短干渉核糖酸(sRNA)分子を特徴とし、二本鎖sRNA分子の一方の鎖は、HIV RNAのヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列またはその一部を含むアンチセンス鎖であり、他方の鎖はアンチセンス鎖のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含むセンス鎖であり、二本鎖sRNA分子中に存在する大部分のポリミジンスヌクレオチドは糖修飾を含む。1つの態様においては、二本鎖sRNA分子中に存在するすべてのポリミジンスヌクレオチドは糖修飾を含む。1つの態様においては、二本鎖sRNA分子の各鎖は約19-約29ヌクレオチドを含み、各鎖は他方の鎖のヌクレオチドに相補的な少なくとも約19ヌクレオチドを含む。別の態様においては、二本鎖sRNA分子は2つ

のオリゴヌクレオチドフラグメントから組み立てられ、一方のフラグメントは s i n A 分子のアンチセンス鎖のヌクレオチド配列を含み、第2のフラグメントは、s i n A 分子のセンス鎖のヌクレオチド配列を含む。さらに別の態様においては、二本鎖 s i n A 分子のセンス鎖は、リソカー分子、例えば、ポリヌクレオチドリソカーまたは非ヌクレオチドリソカーを介してアンチセンス鎖に連結されている。別の態様においては、二本鎖 s i n A 分子のセンス鎖中に存在する任意のポリミジンスケルオチド（すなわち、1またはそれ以上またはすべて）は 2'-デオキシ-2'-フルオロポリミジンスケルオチドであり、センス領域中に存在する任意のポリヌクレオチド（すなわち、1またはそれ以上またはすべて）は 2'-デオキシポリヌクレオチドである。さらに別の態様においては、二本鎖 s i n A 分子のセンス鎖は 3' 末端および 5' 末端を含み、センス鎖の 5' 末端、3' 末端、または 5' 末端および 3' 末端の両方に末端キヤップ成分（例えば、反転デオキシ無塩基成分）が存在する。別の態様においては、二本鎖 s i n A 分子のアンチセンス鎖は 1またはそれ以上の 2'-デオキシ-2'-フルオロポリミジンスケルオチドおよび 1またはそれ以上の 2'-デオキシポリヌクレオチドを含む。さらに別の態様においては、二本鎖 s i n A 分子のアンチセンス鎖に存在する任意のポリミジンスケルオチドは 2'-デオキシ-2'-フルオロポリミジンスケルオチドであり、アンチセンス鎖に存在する任意のポリヌクレオチドは 2'-デオキシポリヌクレオチドである。別の態様においては、二本鎖 s i n A 分子のアンチセンス鎖は 3' 末端にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む。さらに別の態様においては、アンチセンス鎖はアンチセンス鎖の 3' 末端にグリセリル修飾を含む。さらに別の態様においては、アンチセンス鎖の 5' 末端は任意にリン酸基を含む。

【0015】

1つの態様においては、本発明は、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）の複製を阻害する二本鎖短干渉核酸（s i n A）分子を特徴とし、二本鎖 s i n A 分子の鎖の一方は HIV RNA のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列またはその一部を含むアンチセンス鎖であり、他方の鎖はアンチセンス鎖のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含むセンス鎖であり、二本鎖 s i n A 分子中に存在するポリミジンスケルオチドの大部分は糖修飾を含み、前記 s i n A 分子の2つの鎖のそれぞれは 21ヌクレオチドを含む。1つの態様においては、アンチセンス鎖の 21ヌクレオチドが HIV RNA のヌクレオチド配列またはその一部と塩基対形成する。別の態様においては、アンチセンス鎖の約 19ヌクレオチドが HIV RNA のヌクレオチド配列またはその一部と塩基対形成する。1つの態様においては、s i n A 分子の各鎖は、s i n A 分子の他方の鎖の相補的なヌクレオチドと塩基対形成する。別の態様においては、s i n A 分子の各鎖の約 19ヌクレオチドは s i n A 分子の他方の鎖の相補的なヌクレオチドと塩基対形成し、s i n A 分子の各鎖の少なくとも2つの 3' 末端ヌクレオチドは s i n A 分子の他方の鎖のヌクレオチドと塩基対形成しない。1つの態様においては、s i n A 分子の各鎖の塩基対形成していない2つの 3' 末端ヌクレオチドのそれぞれは、2'-デオキシ-ポリミジン、例えば、2'-デオキシチミジンである。

【0016】

1つの態様においては、本発明は、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）の複製を阻害する二本鎖短干渉核酸（s i n A）分子を特徴とし、二本鎖 s i n A 分子の鎖の一方は HIV RNA のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列またはその一部を含むアンチセンス鎖であり、他方の鎖はアンチセンス鎖のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含むセンス鎖であり、二本鎖 s i n A 分子中に存在するポリミジンスケルオチドの大部分は糖修飾を含み、アンチセンス鎖のヌクレオチド配列またはその一部は HIV RNA の 5' -非翻訳領域のヌクレオチド配列またはその一部に相補的である。

【0017】

別の態様においては、本発明は、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）の複製を阻害する二本鎖短干渉核酸（s i n A）分子を特徴とし、二本鎖 s i n A 分子の鎖の一方は HIV RNA のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列またはその一部を含むアンチセン

ス鎖であり、他方の鎖はアンチセンス鎖のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含むセンス鎖であり、二本鎖 s i n A 分子中に存在するポリミジンスケルオチドの大部分は糖修飾を含み、アンチセンス鎖のヌクレオチド配列またはその一部は、すべての HIV の RNA 中に存在する HIV RNA のヌクレオチド配列に相補的である。

【0018】

1つの態様においては、本発明は、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）の複製を阻害する二本鎖短干渉核酸（s i n A）分子を特徴とし、二本鎖 s i n A 分子の一方の鎖は HIV 蛋白質またはそのフラグメントをコードする RNA のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖であり、他方の鎖は、アンチセンス鎖のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含むセンス鎖である。1つの態様においては、二本鎖 s i n A 分子中に存在するポリミジンスケルオチドの大部分は糖修飾を含む。

【0019】

1つの態様においては、本発明の s i n A 分子のアンチセンス鎖のヌクレオチド配列またはその一部は、すべての HIV 株の RNA に存在する HIV RNA のヌクレオチド配列またはその一部に相補的である。

【0020】

1つの態様においては、本発明は、本発明の s i n A 分子を、許容しうる担体または希釈剤中に含む医薬組成物を特徴とする。

【0021】

1つの態様においては、本発明は、本発明の s i n A 分子を含む医薬品を特徴とする。

【0022】

1つの態様においては、本発明は、本発明の s i n A 分子を含む活性成分を特徴とする。

【0023】

1つの態様においては、本発明は、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）の複製を阻害する二本鎖短干渉核酸（s i n A）分子の使用を特徴とし、前記二本鎖 s i n A 分子の一方の鎖は HIV RNA のヌクレオチド配列またはその一部に相補的なヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖であり、他方の鎖は、アンチセンス鎖のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含むセンス鎖であり、前記二本鎖 s i n A 分子中に存在するポリミジンスケルオチドの大部分は糖修飾を含む。

【0024】

1つの態様においては、本発明は、独立してまたは組み合わせて、HIV および/または HIV ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を調節する 1またはそれ以上の s i n A 分子および方法を特徴とする。特に、本発明は、HIV、例えば、HIV-1、HIV-2、および関連するウイルス、例えば、FIV-1 および STV-1；または特定の HIV 遺伝子、例えば、LTR、nef、vif、tat、または rev の発現を調節する s i n A 分子を特徴とする。特定の態様においては、本発明は、HIV-1 をコードする遺伝子、例えば Genbank 受託番号 AJ302647；HIV-2 遺伝子、例えば Genbank 受託番号 NC_001722；FIV-1、例えば Genbank 受託番号 NC_001482；STV-1、例えば Genbank 受託番号 M66437；LTR、例えば Genbank 受託番号 AJ302647 に含まれるもの；nef、例えば Genbank 受託番号 AJ302647 に含まれるもの；vif、例えば Genbank 受託番号 AJ302647 に含まれるもの；tat、例えば Genbank 受託番号 AJ302647 に含まれるもの；および rev、例えば Genbank 受託番号 AJ302647 に含まれるものの発現を調節する、核酸に基づく分子および方法を特徴とする。

【0025】

別の態様においては、本発明は、独立してまたは組み合わせて、HIV-1 のエンベロープ糖蛋白質（env、例えば、Genbank 受託番号 NC_001802）をコードする遺伝子の発現を調節する、例えば、HIV-1 の CD4 レセプター媒介性融合を阻害する 1またはそれ以上の s i n A 分子および方法を特徴とする。特に、本発明は、HIV

のRNAに相補的な配列、例えば、Genbank受託番号NC_001722の配列を含む。別の態様においては、本発明は、FIV-1RNAに対するRNAi活性を有するsina分子を特徴とし、sina分子は、FIV-1のコーディング配列を有する任意のRNAに相補的な配列、例えば、Genbank受託番号NC_001482の配列を含む。別の態様においては、本発明は、SIV-1RNAに対するRNAi活性を有するsina分子を特徴とし、sina分子は、SIV-1のコーディング配列を有する任意のRNAに相補的な配列、例えばGenbank受託番号M66437の配列を含む。

【0035】

さらに別の態様においては、本発明は、Genbank受託番号AJ302647 (HIV-1), NC_001722 (HIV-2), NC_001482 (FIV-1) および/またはM66437 (SIV-1) を含む配列に相補的な配列を含むsina分子を特徴とする。

【0036】

以下に、例示的HIV-1遺伝子 (HIVと称される) を参照して、種々の観点および態様を説明する。しかし、そのような参照は例示のためのものであることを意味し、本明細書に記載される種々の観点および態様はまた、HIVポリペプチドおよび/またはHIVに類似するウイルスのポリペプチドをコードする他の遺伝子、ならびにHIVの細胞標的、例えば本明細書に記載されるものにも向けられている。種々の観点および態様はまた、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染および後天性免疫不全症候群 (AIDS) の進行、発達、または維持に關与する他の遺伝子にも向けられている。これらの追加の遺伝子は、本明細書においてHIVについて説明されている方法を用いて、標的的部位について分析することができ、すなわち、他の遺伝子の阻害およびそのような阻害の効果は、本明細書に記載されるようにして実施することができ、したがって、本明細書において以下に定義され、記載される態様において引用される“HIV”との用語は、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) の感染および後天性免疫不全症候群 (AIDS) の発達または維持に關連する遺伝子、例えば、HIVポリペプチド、および/またはHIV遺伝子に類似するウイルスのポリペプチドをコードする遺伝子、ならびに遺伝子発現のHIV経路および/またはHIV活性に關与する細胞性遺伝子も包含することを意味する。また、本明細書において以下に定義され、記載される態様において引用される“HIV”との用語は、HIV感染に關与するHIVウイルス遺伝子産物および細胞遺伝子産物、例えば本明細書において記載されるものを包含することを意味する。すなわち、本明細書において“HIV”との用語を参照して記載されるそれぞれの態様は、本明細書において定義される“HIV”との用語によりカバーされるすべてのウイルス、細胞性およびウイルス性蛋白質、ペプチド、ポリペプチド、および/またはポリヌクレオチド分子について適用可能である。

【0037】

HIVゲノムの高い配列変異性のため、広い治療用途のためのsina分子の選択には、HIVゲノムの保存領域が含まれるであろう。特に、本発明は、HIVゲノムの保存領域を切断する核酸分子を記載する。したがって、HIVの異なる単離物のすべてを標的とするようsina分子を設計することができる。種々のHIV単離物の保存領域を標的とするよう設計されたsina分子は、様々な患者集団においてHIV複製の有効な阻害が可能とし、HIVゲノムの非保存領域における変異により進化するHIV品種に対するsina分子の有効性を確実にすることができる。したがって、HIVの保存ヌクレオチド配列と相互作用するようsina分子を設計することにより、1つのsina分子をHIVのすべての単離物に対してターゲティングさせることができる (そのような保存配列はすべてのHIV単離物のRNAに存在すると予測される)。

【0038】

1つの態様においては、本発明はHIV遺伝子の発現をダウンレギュレートするsina分子を特徴とし、HIV遺伝子はHIVをコードする配列を含む。

【0039】

1つの態様においては、本発明は、HIV RNAに対するRNAi活性を有するsi

NA分子を特徴とし、sina分子は、HIVまたは他のコーディング配列、例えば、本明細書に開示されるGenbank受託番号を有する例示的配列を有する任意のRNAに相補的な配列を含む。表111および11Vに示されるかまたは本明細書に記載される化学的修飾を本発明の任意のsinaコンストラクトに適用することができる。

【0040】

別の態様においては、本発明は、HIV遺伝子またはHIV感染およびAIDSに關与する関連遺伝子に対するRNAi活性を有するsina分子を特徴とし、sina分子は、そのような遺伝子のヌクレオチド配列、例えば、本明細書に開示されるGenbank受託番号を有する例示的配列に相補的なヌクレオチド配列を含む。別の態様においては、本発明のsina分子は、HIV遺伝子のヌクレオチド配列と相互作用してHIV遺伝子発現のサイレンシングを媒介することができ、またはヌクレオチド配列を含み、例えば、sinaは、HIV遺伝子のクロマチン構造を変化させてHIV遺伝子の転写を防止する細胞プロセスによりHIV遺伝子発現の制御を媒介する。

【0041】

別の態様においては、本発明は、HIV遺伝子のヌクレオチド配列または配列の一部に相補的なヌクレオチド配列、例えばsina分子のアンチセンス領域中のヌクレオチド配列を含むsina分子を特徴とする。別の態様においては、HIV遺伝子配列を含む配列または配列の一部に相補的な領域、例えばsinaコンストラクトのアンチセンス領域を含むsina分子を特徴とする。

【0042】

1つの態様においては、HIV sinaコンストラクトのアンチセンス領域は配列番号1-738または1477-1482のいずれかを有する配列に相補的な配列を含むことができる。1つの態様においては、アンチセンス領域はまた、配列番号739-1477、1491-1498、1507-1514、1523-1530、1535-1538、1547-1554、1557-1558、1567-1574、1595、1597、1599、1601、1603、または1604のいずれかを有する配列を含むことができる。別の態様においては、HIVコンストラクトのアンチセンス領域は、配列番号1-738、1477-1490、1499-1506、1515-1522、1531-1534、1539-1546、1555-1556、1559-1566、1575-1576、1594、1596、1598、1598、1600、または1602のいずれかを有する配列を含むことができる。センス領域は配列番号1583の配列を含むことができ、アンチセンス領域は配列番号1584の配列を含むことができる。センス領域は配列番号1585の配列を含むことができ、アンチセンス領域は配列番号1586の配列を含むことができる。センス領域は配列番号1587の配列を含むことができ、アンチセンス領域は配列番号1588の配列を含むことができる。センス領域は配列番号1590の配列を含むことができ、アンチセンス領域は配列番号1591の配列を含むことができ、アンチセンス領域は配列番号1592の配列を含むことができる。センス領域は配列番号1589の配列を含むことができ、アンチセンス領域は配列番号1593の配列を含むことができる。

【0043】

1つの態様においては、本発明のsina分子は配列番号1-1604のいずれかをを含む。配列番号1-1604に示される配列は限定ではない。本発明のsina分子は任意の連続するHIV配列 (例えば、約19-約25個、または約19、20、21、22、23、24または25個の連続するHIVヌクレオチド) を含むことができる。

【0044】

さらに別の態様においては、本発明は、本明細書に開示されるGenbank受託番号により表される配列を含む配列または配列の一部に相補的な配列、例えばsinaコンストラクトのアンチセンス配列を含むsina分子を特徴とする。表111および11Vに示され、本明細書に記載される化学的修飾を、本発明の任意のsinaコンストラクトに適用することができる。

【0045】
本発明の1つの態様においては、s i n A分子は約19ー約29ヌクレオチドを有するア
ンチセンス鎖を含み、アンチセンス鎖は、H I V蛋白質をコードするRNA配列に相補的
であり、前記s i n Aはさらに、約19ー約29（例えば、約19、20、21、22、
23、24、25、26、27、28または29）ヌクレオチドを有するセンス鎖を含み
、前記センス鎖および前記アンチセンス鎖は、少なくとも約19の相補的ヌクレオチドを
有する別々のヌクレオチド配列である。

【0046】
本発明の別の態様においては、本発明のs i n A分子は、約19ー約29（例えば、約
19、20、21、22、23、24、25、26、27、28または29）ヌクレオチ
ドを有するアンチセンス鎖を含み、アンチセンス鎖は、H I V蛋白質をコードするRNA
配列に相補的であり、前記s i n Aはさらに、約19ー約29ヌクレオチドを有する
センス領域を含み、前記センス領域および前記アンチセンス領域は、少なくとも約19個
の相補的ヌクレオチドを有する直鎖状分子を含む。

【0047】
本発明の1つの態様においては、s i n A分子はH I V蛋白質をコードするヌクレオチ
ド配列またはその一部に相補的なヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖を含む。s i n
Aはさらにセンス鎖を含み、前記センス鎖は、H I V遺伝子またはその一部のヌクレオチ
ド配列を含む。

【0048】
別の態様においては、s i n A分子は、H I V蛋白質をコードするヌクレオチド配列ま
たはその一部に相補的なヌクレオチド配列を含むアンチセンス領域を含む。s i n A分子
はさらにセンス領域を含み、前記センス領域はH I V遺伝子またはその一部のヌクレオチ
ド配列を含む。

【0049】
1つの態様においては、本発明のs i n A分子は、H I V遺伝子によりコードされるRNA
の発現を調節するRNA i活性を有する。H I V遺伝子は互いにある程度の配列ホモ
ロジーを共有することができるため、s i n A分子は、種々のH I V標的の間で共有され
る配列を選択することにより一群のH I V遺伝子（および関連するレセプターまたは
リガンド遺伝子）を標的とすることにより、あるいは、特定のH I V標的にユニークな配列を
選択することにより特定のH I V遺伝子を標的とすることにより、設計することができ
る。したがって、1つの態様においては、s i n A分子は、1つのs i n A分子でいくつものH
I V遺伝子（例えば、異なるH I V株、サブタイプ変種、変異体遺伝子等）を標的と
するように、いくつものH I V遺伝子の間でホモロジーを有するH I V RNA配列の保
存領域を標的とすることができ、別の態様においては、s i n A分子は、特定の
H I V RNA配列にユニークな配列を標的とするよう設計することができる。

【0050】
1つの態様においては、RNA干渉による遺伝子サイレンシング応答のメヂエータと
して作用する本発明の核酸分子は二本鎖核酸分子である。別の態様においては、本発明の
s i n A分子は、約19ー約25（例えば、約19、20、21、22、23、24または
25）ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの間に約19塩基対を含むデュアルレ
ンクから構成される。さらに別の態様においては、本発明のs i n A分子は、約1ー約3
（例えば、約1、2、または3）ヌクレオチドのオーバーハング末端を有するデュアルレ
ンク（例えば、約19塩基対を有し、3'末端モノヌクレオチド、ジヌクレオチド、ま
たはトリヌクレオチドオーバーハングを有する約21ヌクレオチドのデュアルレ
ンクを含む。

【0051】
1つの態様においては、本発明は、H I Vを発現する核酸分子、例えばH I V蛋白質を
コードするRNA iに対しての特異性を有する、1またはそれ以上の化学的に修飾されたs i

NAコンストラクトを特徴とする。そのような化学的修飾の非限定的例には、限定されな
いが、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合、2'ーデオキシリボヌクレオチド、2'
ーO-メチルリボヌクレオチド、2'ーデオキシ-2'ーフルオロリボヌクレオチド、"
万能塩基"ヌクレオチド、"非標的"ヌクレオチド、5'ーC-メチルヌクレオチド、および
末端グアニセリルおよび/または反転デオキシ無塩基残基の取り込みが含まれる。これらの
化学的修飾は、種々のNAコンストラクト中で用いた場合、細胞においてRNA i活
性を保ち、同時に、これらの化合物の血清安定性を劇的に増加させることが示されている
。さらに、P a r r i s h r a（上掲）により公表されたデータに反して、本発明において
は、多数（2以上）のホスホロチオエート置換が充分に許容され、修飾s i n Aコンス
トラクトの血清安定性を実質的に増加させることが示される。

【0052】
1つの態様においては、本発明のs i n A分子は、RNA iを媒介する能力を維持しな
がら、修飾ヌクレオチドを含む。修飾ヌクレオチドを用いて、インビトロまたはインビ
ボでの特性、例えば安定性、活性、および/または生物利用性を改良することができる。例
えば、本発明のs i n A分子は、s i n A分子中に存在するヌクレオチドの総数のパー
センテージとして修飾ヌクレオチドを含むことができる。すなわち、本発明のs i n A分子
は、一般に、約5%ー約100%の修飾ヌクレオチド（例えば、5%、10%、15%、
20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、
70%、75%、80%、85%、90%、95%または100%の修飾ヌクレオチド）
を含むことができる。所定のs i n A分子中に存在する修飾ヌクレオチドの実数のパー
センテージは、s i n A中に存在するヌクレオチドの総数によって異なるであろう。s i n
A分子が一本鎖である場合、修飾のパーセンテージは本鎖s i n A分子中に存在するヌクレ
オチドの総数に基づくことができる。同様に、s i n A分子が二本鎖である場合、修飾の
パーセンテージは、センス鎖、アンチセンス鎖、またはセンス鎖およびアンチセンス鎖の両方
に存在するヌクレオチドの総数に基づくことができる。

【0053】
非限定的例においては、核酸分子中に化学的に修飾されたヌクレオチドを導入すること
は、外的にトリバリーされる天然のRNA分子に固有の、インビトロ安定性および生物利用
性の潜在的な制限を解消する有力な道具を提供する。例えば、化学的に修飾された核酸分
子は血清中でより長い半減期を有する傾向にあるため、化学的に修飾された核酸分子を用
いることにより、所定の治療効果に必要な特定の核酸分子の投与量を低下させることがで
きる。さらに、ある種の化学的修飾は、特定の細胞または組織を標的とすることにより、
および/または核酸分子の細胞取り込みを改良することにより、核酸分子の生物利用性を
改良することができる。したがって、化学的に修飾された核酸分子の活性が、天然の核酸
分子と比較して、例えば、全RNA核酸分子と比較したときに低いとしても、分子の改良
された安定性および/またはトリバリーのため、修飾核酸分子の全体的活性は天然の分子
より高い可能性がある。天然の非修飾s i n Aとは異なり、化学的に修飾されたs i n A
はまた、ヒトにおいてインターフェロン活性を活性化する可能性を最小限にすることがで
きる。

【0054】
本発明のs i n A分子のアンチセンス領域は、前記アンチセンス領域の3'末端にホス
ホロチオエートヌクレオチド間結合を含むことができる。アンチセンス領域は、前記アン
チセンス領域の5'末端に約1ー約5個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む
ことができる。本発明のs i n A分子の3'末端ヌクレオチドオーバーハングは、核酸の
糖、塩基、または骨格で化学的に修飾されたリボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレ
オチドを含むことができる。3'末端ヌクレオチドオーバーハングは、1またはそれ以上
の万能塩基リボヌクレオチドを含むことができる。3'末端ヌクレオチドオーバーハング
は、1またはそれ以上の非環状ヌクレオチドを含むことができる。

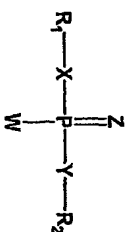
【0055】
本発明の1つの態様は、本発明の少なくとも1つのs i n A分子をコードする核酸配列

を、核機分子の発現を可能とする様式を含む発現ベクターを提供する。本発明の別の態様では、そのような発現ベクターを含む哺乳動物細胞を提供する。哺乳動物細胞はヒト細胞であってもよい。発現ベクターの s i n a 分子は、センス領域およびアンチセンス領域を含むことができる。アンチセンス領域は H i v をコードする R N A または D N A 配列に相補的な配列を含むことができ、センス領域はアンチセンス領域に相補的な配列を含むことができる。s i n a 分子は、相補的なセンス領域およびアンチセンス領域を含む一本の鎖を含むことができる。

[0056]

1つの態様においては、本発明は、細胞の内部でまたは再構成されたインビトロ系において H i v に対する R N A 干渉 (R N A i) を媒介しうる化学的に修飾された短干渉核酸 (s i n a) 分子を特徴とし、ここで、化学的修飾は、式 I :

[化1]



[式中、各 R₁ および R₂ は、独立して、任意のヌクレオチド、非ヌクレオチド、またはポリヌクレオチドであり、これは天然に生ずるものであっても化学的に修飾されたものでもよく、各 X および Y は、独立して、O、S、N、アルキル、または置換アルキルであり、各 Z および W は、独立して、O、S、N、アルキル、置換アルキル、O-アルキル、S-アルキル、アルカニール、またはアラルキルであり、W、X、Y、および Z は任意に全て O でなくともよい]

を有する骨格修飾ヌクレオチド間結合を含む、1またはそれ以上 (例えば、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個またはそれ以上) のヌクレオチドを含む。

[0057]

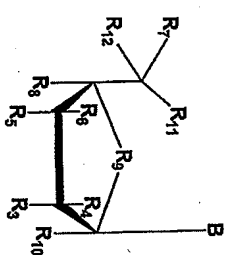
例えば任意の Z、W、X、および/または Y が独立してイオウ原子を含む式 I を有する化学的に修飾されたヌクレオチド間結合は、s i n a デューブリングの一方または両方のオリゴヌクレオチド鎖に、例えば、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖に存在することができ、本発明の s i n a 分子は、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖の 3' 末端、5' 末端、または 3' 末端および 5' 末端の両方に、1またはそれ以上 (例えば、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個またはそれ以上) の式 I を有する s i n a 分子に修飾されたヌクレオチド間結合を含むことができる。例えば、本発明の例示的 s i n a 分子は、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖の 5' 末端に、約 1-約 5 個またはそれ以上 (例えば、約 1、2、3、4、5 個またはそれ以上) の式 I を有する化学的に修飾されたヌクレオチド間結合を含むことができる。別の非限定的例においては、本発明の例示的 s i n a 分子は、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖に式 I を有する化学的に修飾されたヌクレオチド間結合を有する 1またはそれ以上 (例えば、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個またはそれ以上) のポリヌクレオチドを含むことができる。別の態様においては、式 I のヌクレオチド間結合を有する本発明の s i n a 分子はまた、式 I-V I I のいずれかを有する化学的に修飾されたヌクレオチドまたは非ヌクレオチドを含む。

[0058]

1つの態様においては、本発明は、細胞の内部でまたは再構成されたインビトロ系にお

いて H i v に対する R N A 干渉 (R N A i) を媒介しうる化学的に修飾された短干渉核酸 (s i n a) 分子を特徴とし、ここで、化学的修飾は、式 I I :

[化2]



[式中、各 R₃、R₄、R₅、R₆、R₇、R₈、R₉、R₁₀、R₁₁ および R₁₂ は、独立して、H、OH、アルキル、置換アルキル、アルカニールまたはアラルキル、F、Cl、Br、C、N、CF₃、OCF₃、OCN、O-アルキル、S-アルキル、N-アルキル、O-アルケニル、S-アルケニル、N-アルケニル、SO-アルキル、アルキル-O-SH、アルキル-OH、O-アルキル-OH、O-アルキル-SH、S-アルキル-OH、S-アルキル-SH、アルキル-S-アルキル、アルキル-O-アルキル、ONO₂、NO₂、N₃、NH₂、アミノアルキル、アミノ酸、アミノアシル、ONH₂、O-アミノアルキル、O-アミノ酸、O-アミノアシル、ヘテロシクロアルキル、または式 I を有する基であり、アミノアルキルアミノ、ポリアルキルアミノ、置換シリル、または式 I を有する基であり；R₉ は、O、S、CH₂、S=O、CHF₃、または CF₂ であり、B は、ヌクレオチド塩基、例えば、アデニン、グアニン、ウラシル、シトシン、チミン、2-アミノアデニン、5-メチルシトシン、2、6-ジアミノアデニン、または糖質的 R N A に相補的であって相補的でないけれども他の任意の天然に生じない塩基、または非ヌクレオチド塩基、例えば、フェニル、ナフチル、3-ニトロピロニル、5-ニトロインボニル、ネオラリル、トリリン、トリジン、または糖質的 R N A に相補的であっても相補的でないけれども他の任意の天然に生じない塩基である]

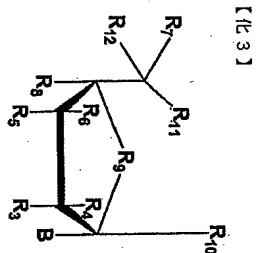
を有する 1またはそれ以上 (例えば、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個またはそれ以上) のヌクレオチドまたは非ヌクレオチドを含む。

[0059]

式 I I の化学的に修飾されたヌクレオチドまたは非ヌクレオチドは、s i n a デューブリングの一方または両方のオリゴヌクレオチド鎖、例えば、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖に存在することができ、本発明の s i n a 分子は、1またはそれ以上の式 I I の化学的に修飾されたヌクレオチドまたは非ヌクレオチドを、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖の 3' 末端、5' 末端、または 3' 末端および 5' 末端の両方に含むことができる。例えば、本発明の例示的 s i n a 分子は、約 1-約 5 個またはそれ以上 (例えば、約 1、2、3、4、5 個またはそれ以上) の式 I I の化学的に修飾されたヌクレオチドまたは非ヌクレオチドを、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖の 5' 末端に含むことができる。別の非限定的例においては、本発明の例示的 s i n a 分子は、約 1-約 5 個またはそれ以上 (例えば、約 1、2、3、4、5 個またはそれ以上) の式 I I の化学的に修飾されたヌクレオチドまたは非ヌクレオチドを、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖の 3' 末端に含むことができる。

[0060]

1つの態様においては、本発明は、細胞の内部でまたは再構成されたインビトロ系において H i v に対する R N A 干渉 (R N A i) を媒介しうる化学的に修飾された短干渉核酸 (s i n a) 分子を特徴とし、ここで、化学的修飾は、式 I I I :



【式中、
各R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11およびR12は、独立して、H, OH, アルキル、置換アルキル、アルカニールまたはアラキル、F, Cl, Br, C, N, CF3, OCF3, OCN, O-アルキル、S-アルキル、N-アルキル、O-アルキル、S-アルキル、N-アルキル、SO-アルキル、アルキル-OSH, アルキル-OH, O-アルキル-OH, O-アルキル-SH, S-アルキル-OH, S-アルキル-SH, アルキル-S-アルキル、アルキル-O-アルキル、ONO2, NO2, N3, NH2, アミノアルキル、アミノ、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカニール、アミノアルキル、アミノアルカニール、置換シリル、または式Iを有する基であり、R9は、O, S, CH2, S=O, CHF, またはCF2であり、Bは、スクレオシド塩基、例えば、アデニン、グアニン、ウラシル、シトシン、チミン、2-アミノアデニン、5-メチルシトシン、2,6-ジアミノアデニン、または標的RNAに相補的であつても相補的でないように用いることができる他の任意の天然に生じない塩基、または非スクレオシド塩基、例えば、フェニル、ナフチル、3-ニトロピロール、5-ニトロインドール、ネオアラニン、ピリジン、ピリジノン、または標的RNAに相補的であつても相補的でないように他の任意の天然に生じない万能塩基である】
を有する1またはそれ以上（例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上）のスクレオチドまたは非スクレオチドを含む。

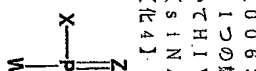
【0061】

式Iの化学的に修飾されたスクレオチドまたは非スクレオチドは、sINAデュープレックスの一方または両方のオリゴヌクレオチド鎖に、例えば、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方に、1またはそれ以上の式Iの化学的に修飾されたスクレオチドまたは非スクレオチドを含むことができる。例えば、本発明の例示的sINA分子は、センス鎖、約1, 2, 3, 4, 5個またはそれ以上の式Iの化学的に修飾されたスクレオチドまたは非スクレオチドを含むことができる。別の非限定的例においては、本発明の例示的sINA分子は、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖の3'末端に、約1-約5個またはそれ以上の式Iの化学的に修飾されたスクレオチドまたは非スクレオチドを含むことができる。

【0062】

別の態様においては、本発明のsINA分子は、式IまたはIを有するスクレオチドを含み、ここで、式IまたはIを有するスクレオチドは反転のコグニグエーションである。例えば、式IまたはIを有するスクレオチドは、sINACコンストラクトに3'-3', 3'-2', 2'-3', または5'-5'コグニグエーションで、例えば、sINA鎖の一方または両方の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方に結合させることができる。

50



【0063】
1つの態様においては、本発明は、細胞の内部または再構成されたインビトロ系に存在してHIVに結合するRNA干渉（RNAi）を媒介しうる化学的に修飾された短干渉核酸（sINA）分子を特徴とし、ここで、化学的修飾は、式I V:

【式中、
各XおよびYは、独立して、O, S, N, アルキル、置換アルキル、またはアルキルハロであり；各ZおよびWは、独立して、O, S, N, アルキル、置換アルキル、O-アルキル、S-アルキル、アルカニール、アラキル、またはアルキルハロであり；W, X, YおよびZはすべてOではない】
を有する5'末端リン酸基を含む。

【0064】

1つの態様においては、本発明は、標的RNAに相補的な鎖に式I Vを有する5'末端リン酸基を有するsINA分子を特徴とし、ここで、sINA分子は、全RNA sINA分子を含む。別の態様においては、本発明は、標的RNAに式I Vを有する5'末端リン酸基を有するsINA分子を特徴とし、ここで、sINA分子はまた、一方または両方の鎖の3'末端に約1-約4個（例えば、約1, 2, 3, または4個）のデオキシリボスクレオチドを有する、約1-約3（例えば、約1, 2, または3）スクレオチドの3'末端スクレオチドを含む。別の態様においては、式I Vを有する5'末端リン酸基は、本発明のsINA分子、例えば式I-VIのいずれかを有する化学的修飾を有するsINA分子の標的RNAに存在する。

【0065】

1つの態様においては、本発明は、細胞の内部または再構成されたインビトロ系に存在してHIVに対するRNA干渉（RNAi）を媒介しうる化学的に修飾された短干渉核酸（sINA）分子を特徴とし、ここで、化学的修飾は1またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む。例えば、非限定的例においては、本発明は、一方のsINA鎖に約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8個またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有する化学的に修飾された短干渉核酸（sINA）を特徴とする。さらに別の態様においては、本発明は、両方のsINA鎖に独立して約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8個またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有する化学的に修飾された短干渉核酸（sINA）を特徴とする。ホスホロチオエートヌクレオチド間結合は、sINAデュープレックスのオリゴヌクレオチド鎖の一方または両方に、例えば、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方に1またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むことができる。例えば、本発明の例示的sINA分子は、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖の3'末端に、約1-約5個またはそれ以上の式Iの化学的に修飾されたスクレオチドまたは非スクレオチドを含むことができる。別の非限定的例においては、本発明の例示的sINA分子は、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖の3'末端に、約1-約5個またはそれ以上の式Iの化学的に修飾されたスクレオチドまたは非スクレオチドを含むことができる。

5

エートヌクレオチド間結合を含むことができる。

【0066】

1つの態様においては、本発明は、センズ鎖が1またはそれ以上、例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合、および/または1またはそれ以上（例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上）の2'-デオキシ-, 2'-O-メチル-, 2'-デオキシ-, 2'-フルオロ-, および/または1またはそれ以上の（例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上）の万能塩基修飾ヌクレオチドを含み、任意にセンズ鎖の3'末端, 5'末端, または3'末端および5'末端の両方に末端キヤップ分子を含み; かつ、アンチセンス鎖が約1-約10個またはそれ以上、特に約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合、および/または1またはそれ以上（例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上）の2'-デオキシ-, 2'-O-メチル-, 2'-デオキシ-, 2'-フルオロ-, および/または1またはそれ以上の（例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上）の万能塩基修飾ヌクレオチドを含み、任意にアンチセンス鎖の3'末端, 5'末端, または3'末端および5'末端の両方に末端キヤップ分子を含む s i n A 分子を特徴とする。別の態様においては、センズおよび/またはアンチセンス s i n A 分子を特徴とする。別の態様においては、アンチセンス s i n A 分子の1またはそれ以上の（例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上の）ポリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-, 2'-O-メチル-, および/または2'-デオキシ-, 2'-フルオロヌクレオチドで化学的に修飾されており、同じまたは異なる鎖に存在する1またはそれ以上の、例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合、および/または3'末端, 5'末端, または3'末端および5'末端の両方に末端キヤップ分子を有している。以下もよい。

【0067】

別の態様においては、本発明は、センズ鎖が約1-約5個、特に約1, 2, 3, 4, または5個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合、および/または1またはそれ以上（例えば、約1, 2, 3, 4, 5個またはそれ以上）の2'-デオキシ-, 2'-O-メチル-, 2'-デオキシ-, 2'-フルオロ-, および/または1またはそれ以上（例えば、約1, 2, 3, 4, 5個またはそれ以上）の万能塩基修飾ヌクレオチドを含み、任意にセンズ鎖の3'末端, 5'末端, または3'末端および5'末端の両方に末端キヤップ分子を含み; かつ、アンチセンス鎖が約1-約5個またはそれ以上、特に約1, 2, 3, 4, 5個またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合、および/または1またはそれ以上（例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上）の2'-デオキシ-, 2'-O-メチル-, 2'-デオキシ-, 2'-フルオロ-, および/または1またはそれ以上（例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上）の万能塩基修飾ヌクレオチドを含み、任意にアンチセンス鎖の3'末端, 5'末端, または3'末端および5'末端の両方に末端キヤップ分子を含み、任意にセンズ鎖の3'末端, 5'末端, または3'末端および5'末端の両方に末端キヤップ分子を有している。以下もよい。

【0068】

1つの態様においては、本発明は、アンチセンス鎖が1またはそれ以上、例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合、および/または約1またはそれ以上（例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上）の2'-デオキシ-, 2'-O-メチル-, 2'-

デオキシ-, 2'-フルオロ-, および/または1またはそれ以上（例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上）の万能塩基修飾ヌクレオチドを含み、任意にセンズ鎖の3'末端, 5'末端, または3'末端および5'末端の両方に末端キヤップ分子を含み; かつ、アンチセンス鎖が約1-約10個またはそれ以上、特に約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合、および/または1またはそれ以上（例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上）の2'-デオキシ-, 2'-O-メチル-, 2'-デオキシ-, 2'-フルオロ-, および/または1またはそれ以上（例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上）の万能塩基修飾ヌクレオチドを含み、任意にアンチセンス s i n A 分子を特徴とする。別の態様においては、センズおよび/またはアンチセンス s i n A 分子の1またはそれ以上の（例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上の）ポリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-, 2'-O-メチル-, および/または2'-デオキシ-, 2'-フルオロヌクレオチドで化学的に修飾されており、同じまたは異なる鎖に存在する1またはそれ以上の、例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合、および/または3'末端, 5'末端, または3'末端および5'末端の両方に末端キヤップ分子を有している。以下もよい。

【0069】

別の態様においては、本発明は、アンチセンス鎖が約1-約5個またはそれ以上、特に約1, 2, 3, 4, 5個またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合、および/または1またはそれ以上（例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上）の2'-デオキシ-, 2'-O-メチル-, 2'-デオキシ-, 2'-フルオロ-, および/または1またはそれ以上（例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上）の万能塩基修飾ヌクレオチドを含み、任意にセンズ鎖の3'末端, 5'末端, または3'末端および5'末端の両方に末端キヤップ分子を含み; かつ、アンチセンス鎖が約1-約5個またはそれ以上、特に約1, 2, 3, 4, 5個またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合、および/または1またはそれ以上（例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上）の2'-デオキシ-, 2'-O-メチル-, 2'-デオキシ-, 2'-フルオロ-, および/または1またはそれ以上（例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上）の万能塩基修飾ヌクレオチドを含み、任意にアンチセンス鎖の3'末端, 5'末端, または3'末端および5'末端の両方に末端キヤップ分子を含み、任意にセンズ鎖の3'末端, 5'末端, または3'末端および5'末端の両方に末端キヤップ分子を有している。以下もよい。

【0070】

1つの態様においては、本発明は、s i n A 分子の各鎖に約1-約5個、特に約1, 2, 3, 4, 5個またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有する、化学的に修飾された短干渉核酸 (s i n A) 分子を特徴とする。

【0071】

別の態様においては、本発明は、2'-5'ヌクレオチド間結合を含む s i n A 分子を特徴とする。2'-5'ヌクレオチド間結合は、s i n A 配列鎖の一方または両方の3'末端, 5'末端, または3'末端および5'末端の両方に存在することができる。さらに、2'-5'ヌクレオチド間結合は、s i n A 配列鎖の一方または両方の種々の他の位置に存在することができる。例えば、s i n A 分子の一方または両方の鎖のポリミジンヌクレ

オチドの約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上, 例えばすべてのヌクレオチド間結合は, 2'-5'ヌクレオチド間結合を含むことができ, またはs i N A分子の一方または両方の鎖のプリンスケレオチドの約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上, 例えばすべてのヌクレオチド間結合は, 2'-5'ヌクレオチド間結合を含むことができる。

[0072]

別の態様においては, 本発明の化学的に修飾されたs i N A分子は, 2つの鎖を有するデュープレックスを含み, この一方または両方を化学的に修飾することができ, 各鎖は約18-約27 (例えば, 約18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, または27)ヌクレオチドの長さであり, デュープレックスは約18-約23 (例えば, 約18, 19, 20, 21, 22, または23)塩基対を有し, 化学的修飾は, 式I-VIのいずれかを有する構造を含む。例えば, 本発明の化学的に修飾された例示的なs i N A分子は2つの鎖を有するデュープレックスを含み, この一方または両方は式I-VIのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有する化学的修飾で化学的に修飾されていてもよく, 各鎖は約21ヌクレオチドからなり, それぞれは2ヌクレオチドの3'末端ヌクレオチド-パーハングを有し, デュープレックスは約19塩基対を有する。別の態様においては, 本発明のs i N A分子は一本鎖ヘアピン構造を有し, ここで, s i N Aは約36-約70 (例えば, 約36, 40, 45, 50, 55, 60, 65, または70)ヌクレオチドの長さであり, 約18-約23 (例えば, 約18, 19, 20, 21, 22, または23)塩基対を有し, s i N Aは式I-VIのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有する構造を含むことができる。例えば, 本発明の化学的に修飾された例示的なs i N A分子は, 式I-VIのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有する化学的修飾で化学的に修飾された, 約42-約50 (例えば, 約42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, または50)ヌクレオチドを有する直鎖状オリゴヌクレオチドを含み, ここで, 直鎖状オリゴヌクレオチドは約19塩基対および2ヌクレオチドの3'末端ヌクレオチド-パーハングを有するヘアピン構造を形成する。別の態様においては, 本発明の直鎖状ヘアピンs i N A分子はヌクレオチドを含み, ここで, s i N A分子のループ部分は生物分解性である。例えば, 本発明の直鎖状ヘアピンs i N A分子は, s i N A分子のループ部分のインデボでの分解により3'末端パーハング, 例えば約2ヌクレオチドを含む3'末端ヌクレオチド-パーハングを有する二本鎖s i N A分子が生成されるように設計される。

20

[0073]

別の態様においては, 本発明のs i N A分子は環状核酸分子を含み, ここで, s i N Aは約38-約70 (例えば, 約38, 40, 45, 50, 55, 60, 65, または70)ヌクレオチドの長さであり, 約18-約23 (例えば, 約18, 19, 20, 21, 22, または23)塩基対を有し, s i N Aは化学的修飾を含むことができ, これは式I-VIのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有する構造を含む。例えば, 本発明の化学的に修飾された例示的なs i N A分子は, 式I-VIのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有する化学的修飾で化学的に修飾された約42-約50 (例えば, 約42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, または50)ヌクレオチドを有する環状オリゴヌクレオチドを含み, 環状オリゴヌクレオチドは約19塩基対および2個のループを有するダンベル形状の構造を形成する。

[0074]

別の態様においては, 本発明の環状s i N A分子は, 2つのループモチーフを含み, ここで, s i N A分子のループ部分の一方または両方は生物分解性である。例えば, 本発明の環状s i N A分子は, s i N A分子のループ部分のインデボでの分解により, 3'末端パーハング, 例えば約2ヌクレオチドを含む3'末端ヌクレオチド-パーハングを有する二本鎖s i N A分子が生成することができるよう設計される。

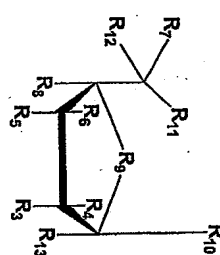
[0075]

1つの態様においては, 本発明のs i N A分子は, 少なくとも1つ (例えば, 約1, 2

30

3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上)の無塩基成分, 例えば, 式V:

[化5]



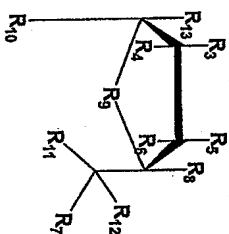
[式中,

各R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11, R12, およびR13は, 独立して, H, OH, アルキル, 置換アルキル, アルカニールまたはアラキル, F, Cl, Br, CN, CF3, OCF3, OCN, O-アルキル, S-アルキル, N-アルキル, O-アルケニル, S-アルケニル, N-アルケニル, SO-アルキル, アルキル-OS, H, アルキル-OH, O-アルキル-OH, O-アルキル-SH, S-アルキル-OH, S-アルキル-SH, アルキル-S-アルキル, アルキル-O-アルキル, ONO2, N, O2, N3, NH2, アミノアルキル, アミノ酸, アミノアシル, O-アミノアルキル, O-アミノ酸, O-アミノアシル, ヘテロシクロアルキル, または式Iを有する基であり; R9は, O, S, CH2, S=O, CHF, またはCF2である]

[0076]

1つの態様においては, 本発明のs i N A分子は, 少なくとも1つ (例えば, 約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上)の反転無塩基成分, 例えば, 式VI:

[化6]



[式中,

各R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11, R12, およびR13は, 独立して, H, OH, アルキル, 置換アルキル, アルカニールまたはアラキル, F, Cl, Br, CN, CF3, OCF3, OCN, O-アルキル, S-アルキル, N-アルキル, O-アルケニル, S-アルケニル, N-アルケニル, SO-アルキル, アルキル-OS, H, アルキル-OH, O-アルキル-OH, O-アルキル-SH, S-アルキル-OH, S-アルキル-SH, アルキル-S-アルキル, アルキル-O-アルキル, ONO2, N, O2, N3, NH2, アミノアルキル, アミノ酸, アミノアシル, O-アミノアルキル, O-アミノ酸, O-アミノアシル, ヘテロシクロアルキル, または式Iを有する基であり; R9は, O, S, CH2, S=O, CHF, またはCF2であり, R2, R

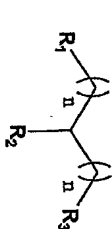
50

3. R8またはR13のいずれかは、本発明のs i N A分子への結合の点として働く」を有する化合物を含む。

【0077】

別の懸架においては、本発明の s i N A 分子は、少なくとも 1 つ（例えば、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個、またはそれ以上）の置換ポリアルキル成分、例えば、式 V I I :

【化7】



〔式中、各 n は、独立して、1—12の整数であり、各 R_1 、 R_2 および R_3 は、独立して、 H 、 OH 、アルキル、置換アルキル、アルカリールまたはアラールキル、 F 、 Cl 、 Br 、 CN 、 CF_3 、 OCF_3 、 OCN 、 O —アルキル、 S —アルキル、 N —アルキル、 O —アルケニル、 S —アルケニル、 N —アルケニル、 SO —アルキル、アルキル— OH 、 S —アルキル— OH 、 O —アルキル— OH 、 O —アルキル— SH 、 S —アルキル— OH 、 S —アルキル— SH 、 $アルキル-S-アルキル$ 、 $アルキル-ONH_2$ 、 NO_2 、 $アルキル-NH_2$ 、 $アミノアルキル$ 、 $アミノ酸$ 、 $アミノアシル$ 、 ONH_2 、 O — $アミノアルキル$ 、 O — $アミノ酸$ 、 O — $アミノアシル$ 、 $ヘテロシクロアルキル$ 、 $ヘテロシクロアルカリール$ 、 $アミノアルキルアミノ$ 、 $ポリアルキルアミノ$ 、置換シリル、または式Iを有する基であり、 R_1 、 R_2 または R_3 は、本発明の $SiNA$ 分子への結合の点として働く〕を有する化合物を含む。

100781

別の幾種においては、本発明は、R1 および R2 はヒドロキシル (OH) 基であり、R3 は O を含み、かつ本発明の二本鎖 s i n A 分子の一方または両方の鎖の 1, 未端, 5' 未端, または 3' 未端の両方への、または本発明の一本鎖 s i n A 分子への結合の点である、式 VI を有する化合物を特徴とする。この修飾は、本明細書において“グリセリル”と称される (例えば、図 10 の修飾 6 を参照)。

100791

別の態様においては、式V、VIまたはVIIのいずれかを有する本発明の成分は、本発明のs i n A分子の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方に存在する。例えば、式V、VIまたはVIIを有する成分は、s i n A分子のアンチセンス鎖、センス鎖、またはアンチセンス鎖およびセンス鎖の両方の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方に存在することができ、式VIIを有する成分は、式IIIは、本明細書に記載されるように、ヘアピンs i n A分子の3'末端または5'末端に存在することができる。

10800

別の幾縁においては、本発明の $s\text{-}1\text{-}n\text{A}$ 分子は、式 V または VI を有する無塩基残基を含み、ここで、式 VI または VI を有する無塩基残基は、 $3'-3', 3'-2', 2'-3', 2'-2'$ または $5'-5'$ コンフイグエンションで、一方または両方の $s\text{-}1\text{-}n\text{A}$ 残基の $3'$ 、末端、 $5'$ 、末端、または $3'$ 、末端の両方で $s\text{-}1\text{-}n\text{A}$ コンフイグエンションに結合している。

18001

1つの懸端においては、本発明の s i n A 分子は、例えば、s i n A 分子の 5' 末端、3' 末端、5' 末端および 3' 末端の両方、またはそれらの任意の組み合わせにおいて、1またはそれ以上（例えば、約 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 個またはそれ以上）のロックス核酸（LNA）ヌクレオチドを含む。

100.82

別の意味においては、本発明の s i n A 分子は、例えば、s i n A 分子の 5' 末端、3' 末端、5' 末端および 3' 末端の両方、またはそれらの任意の組み合わせにおいて、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個またはそれ以上（例えば、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個またはそれ以上）の非環状ヌクレオチドを含む。

【0083】

1 つの概念においては、本証明は、化学的に修飾された SiNA がセソ領域を含む本証明の化学的に修飾された短干渉核酸 (SiNA) 分子を特徴とし、ここで、セソ領域中に存在する任意の (例えば、1 またはそれ以上、またはすべての) ポリジンスクアロキシド は 2° 、 1° 、 3° 、 4° 、 5° 、 6° 、 7° 、 8° 、 9° 、 10° 、 11° 、 12° 、 13° 、 14° 、 15° 、 16° 、 17° 、 18° 、 19° 、 20° 、 21° 、 22° 、 23° 、 24° 、 25° 、 26° 、 27° 、 28° 、 29° 、 30° 、 31° 、 32° 、 33° 、 34° 、 35° 、 36° 、 37° 、 38° 、 39° 、 40° 、 41° 、 42° 、 43° 、 44° 、 45° 、 46° 、 47° 、 48° 、 49° 、 50° 、 51° 、 52° 、 53° 、 54° 、 55° 、 56° 、 57° 、 58° 、 59° 、 60° 、 61° 、 62° 、 63° 、 64° 、 65° 、 66° 、 67° 、 68° 、 69° 、 70° 、 71° 、 72° 、 73° 、 74° 、 75° 、 76° 、 77° 、 78° 、 79° 、 80° 、 81° 、 82° 、 83° 、 84° 、 85° 、 86° 、 87° 、 88° 、 89° 、 90° 、 91° 、 92° 、 93° 、 94° 、 95° 、 96° 、 97° 、 98° 、 99° 、 100° 、 101° 、 102° 、 103° 、 104° 、 105° 、 106° 、 107° 、 108° 、 109° 、 110° 、 111° 、 112° 、 113° 、 114° 、 115° 、 116° 、 117° 、 118° 、 119° 、 120° 、 121° 、 122° 、 123° 、 124° 、 125° 、 126° 、 127° 、 128° 、 129° 、 130° 、 131° 、 132° 、 133° 、 134° 、 135° 、 136° 、 137° 、 138° 、 139° 、 140° 、 141° 、 142° 、 143° 、 144° 、 145° 、 146° 、 147° 、 148° 、 149° 、 150° 、 151° 、 152° 、 153° 、 154° 、 155° 、 156° 、 157° 、 158° 、 159° 、 160° 、 161° 、 162° 、 163° 、 164° 、 165° 、 166° 、 167° 、 168° 、 169° 、 170° 、 171° 、 172° 、 173° 、 174° 、 175° 、 176° 、 177° 、 178° 、 179° 、 180° 、 181° 、 182° 、 183° 、 184° 、 185° 、 186° 、 187° 、 188° 、 189° 、 190° 、 191° 、 192° 、 193° 、 194° 、 195° 、 196° 、 197° 、 198° 、 199° 、 200° 、 201° 、 202° 、 203° 、 204° 、 205° 、 206° 、 207° 、 208° 、 209° 、 210° 、 211° 、 212° 、 213° 、 214° 、 215° 、 216° 、 217° 、 218° 、 219° 、 220° 、 221° 、 222° 、 223° 、 224° 、 225° 、 226° 、 227° 、 228° 、 229° 、 230° 、 231° 、 232° 、 233° 、 234° 、 235° 、 236° 、 237° 、 238° 、 239° 、 240° 、 241° 、 242° 、 243° 、 244° 、 245° 、 246° 、 247° 、 248° 、 249° 、 250° 、 251° 、 252° 、 253° 、 254° 、 255° 、 256° 、 257° 、 258° 、 259° 、 260° 、 261° 、 262° 、 263° 、 264° 、 265° 、 266° 、 267° 、 268° 、 269° 、 270° 、 271° 、 272° 、 273° 、 274° 、 275° 、 276° 、 277° 、 278° 、 279° 、 280° 、 281° 、 282° 、 283° 、 284° 、 285° 、 286° 、 287° 、 288° 、 289° 、 290° 、 291° 、 292° 、 293° 、 294° 、 295° 、 296° 、 297° 、 298° 、 299° 、 300° 、 301° 、 302° 、 303° 、 304° 、 305° 、 306° 、 307° 、 308° 、 309° 、 310° 、 311° 、 312° 、 313° 、 314° 、 315° 、 316°

10084

一つの態様においては、本発明は、化学的に修飾された s i n A がセツス領域を含む。本発明の化学的に修飾された短干渉技術（s i n A）分子を特徴とし、ここで、セツス領域中に存在する任意の（例えば 1 またはそれ以上、またはすべての）ポリミジンスラクシオチドは 2' -デオキシ-2'-アルオロポリミジンスラクシオチドであり（例えば、すべてのポリミジンスラクシオチドが 2' -デオキシ-2'-アルオロポリミジンスラクシオチドであり、かつ、セツス領域中に存在する任意の（例えば、1 またはそれ以上の、またはすべての）ポリンスラクシオチドは 2' -デオキシポリンスラクシオチドであるか）、あるいは複数のポリンスラクシオチドが 2' -デオキシポリンスラクシオチドであるか、あるいは複数のポリンスラクシオチドが 2' -デオキシポリンスラクシオチドであるか、で前記セツス領域中に存在する 3' 末端ヌクレオチドオーバーハングを含む任意のヌクレオチドは 2' -デオキシヌクレオチドである。

10085

一つの懸案においては、本発明は、化学的に修飾された s i n A がアランチセンス領域を含む、本発明の化学的に修飾された短干渉核酸 (s i n A) 分子を特徴とし、ここで、アランチセンス領域中に存在する任意の (例えば、1またはそれ以上、またはすべての) 2° ミジンヌククレオチドは 2° -チオキジー-2'-フルオロおよび 2° -フルオロおよび 2° -チオキジー-2'-フルオロ 2° ミジンヌククレオチドであり (例えば、すべての 2° ミジンヌククレオチドが 2° -チオキジー-2'-フルオロ 2° ミジンヌククレオチドであり、あるいは複数の 2° -チオキジー-2'-フルオロ 2° ミジンヌククレオチドが 2° -チオキジー-2'-フルオロ 2° ミジンヌククレオチドであるか、かつ、アランチセンス領域中に存在する任意の (例えば、1またはそれ以上、またはすべての) 2° -O-メチル 2° -O-メチル 2° ミジンヌククレオチドである (例えば、すべての 2° -O-メチル 2° ミジンヌククレオチドであるか、あるいは複数の 2° -O-メチル 2° ミジンヌククレオチドである)。

98001

この懸念においては、本発明は、化学的に修飾された $s\text{-INA}$ がアブセセンス領域を、1つの懸念においては、化学的に修飾された短干渉核酸 (sRNA) 分子を特徴し、ここで、アブセセンス領域中に存在する任意の (例えば、1またはそれ以上、またはすべての) 2° 、 3° 、 4° 、 5° 、 6° 、 7° 、 8° 、 9° 、 10° 、 11° 、 12° 、 13° 、 14° 、 15° 、 16° 、 17° 、 18° 、 19° 、 20° 、 21° 、 22° 、 23° 、 24° 、 25° 、 26° 、 27° 、 28° 、 29° 、 30° 、 31° 、 32° 、 33° 、 34° 、 35° 、 36° 、 37° 、 38° 、 39° 、 40° 、 41° 、 42° 、 43° 、 44° 、 45° 、 46° 、 47° 、 48° 、 49° 、 50° 、 51° 、 52° 、 53° 、 54° 、 55° 、 56° 、 57° 、 58° 、 59° 、 60° 、 61° 、 62° 、 63° 、 64° 、 65° 、 66° 、 67° 、 68° 、 69° 、 70° 、 71° 、 72° 、 73° 、 74° 、 75° 、 76° 、 77° 、 78° 、 79° 、 80° 、 81° 、 82° 、 83° 、 84° 、 85° 、 86° 、 87° 、 88° 、 89° 、 90° 、 91° 、 92° 、 93° 、 94° 、 95° 、 96° 、 97° 、 98° 、 99° 、 100° 、 101° 、 102° 、 103° 、 104° 、 105° 、 106° 、 107° 、 108° 、 109° 、 110° 、 111° 、 112° 、 113° 、 114° 、 115° 、 116° 、 117° 、 118° 、 119° 、 120° 、 121° 、 122° 、 123° 、 124° 、 125° 、 126° 、 127° 、 128° 、 129° 、 130° 、 131° 、 132° 、 133° 、 134° 、 135° 、 136° 、 137° 、 138° 、 139° 、 140° 、 141° 、 142° 、 143° 、 144° 、 145° 、 146° 、 147° 、 148° 、 149° 、 150° 、 151° 、 152° 、 153° 、 154° 、 155° 、 156° 、 157° 、 158° 、 159° 、 160° 、 161° 、 162° 、 163° 、 164° 、 165° 、 166° 、 167° 、 168° 、 169° 、 170° 、 171° 、 172° 、 173° 、 174° 、 175° 、 176° 、 177° 、 178° 、 179° 、 180° 、 181° 、 182° 、 183° 、 184° 、 185° 、 186° 、 187° 、 188° 、 189° 、 190° 、 191° 、 192° 、 193° 、 194° 、 195° 、 196° 、 197° 、 198° 、 199° 、 200° 、 201° 、 202° 、 203° 、 204° 、 205° 、 206° 、 207° 、 208° 、 209° 、 210° 、 211° 、 212° 、 213° 、 214° 、 215° 、 216° 、 217° 、 218° 、 219° 、 220° 、 221° 、 222° 、 223° 、 224° 、 225° 、 226° 、 227° 、 228° 、 229° 、 230° 、 231° 、 232° 、 233° 、 234° 、 235° 、 236° 、 237° 、 238° 、 239° 、 240° 、 241° 、 242° 、 243° 、 244° 、 245° 、 246° 、 247° 、 248° 、 249° 、 250° 、 251° 、 252° 、 253° 、 254° 、 255° 、 256° 、 257° 、 258° 、 259° 、 260° 、 261° 、 262° 、 263° 、 264° 、 265° 、 266° 、 267° 、 268° 、 269° 、 270° 、 271° 、 272° 、 273° 、 274° 、 275° 、 276° 、 277° 、 278° 、 279° 、 280° 、 281° 、 282° 、 283° 、 284° 、 285° 、 286° 、 287° 、 288° 、 289° 、 290° 、 291° 、 292° 、 293° 、 294° 、 295° 、 296° 、 297° 、 298° 、 299° 、 300° 、 301° 、 302° 、 303° 、 304° 、 305° 、 306° 、 307° 、 308° 、 309° 、 310° 、 311° 、 312° 、 313° 、 314° 、 315° 、 316° 、 317° 、 $318^{\circ}</$

ルブリンスケレオチドであり（例えば、すべてのブリンスケレオチドが2'-O-メチルブリンスケレオチドであるか、あるいは複数のブリンスケレオチドが2'-O-メチルブリンスケレオチドである）、ここで、前記アプセセンス領域中に存在する3'末端ヌクレオチドオーバーハングを含む任意のヌクレオチドは2'-デオキシヌクレオチドである。

1 つの態様においては、本発明は、化学的に修飾された s i n a がアンチセンス領域を含む本発明の化学的に修飾された短干渉核酸 (s i n a) 分子を特徴とし、ここで、アンチセンス領域中に存在する任意の (例えば、1 またはそれ以上、またはすべての) ペリジンスケレオチドは 2' -デオキシ-2'-フルオロペリジンスケレオチドであり (例えば、すべてのペリジンスケレオチドが 2' -デオキシ-2'-フルオロペリジンスケレオチドが 2' -デオキシ-2'-フルオロペリジンスケレオチドであるか、あるいは複数のペリジンスケレオチドが 2' -デオキシ-2'-フルオロペリジンスケレオチドであるか、かつ、アンチセンス領域中に存在する任意の (例えば、1 またはそれ以上、またはすべての) アリンスケレオチドは 2' -デオキシアリンスケレオチドであるか、あるいは複数のアリンスケレオチドが 2' -デオキシアリンスケレオチドである)。

【8800】

これらの結果においては、本発明は、細胞の内側または再構成されたインビトロ系における短時間でのRNAに対する干渉(RNA i)を媒介しうる、本発明の化学的に修飾されたsiRNAはセクス領域を修飾(sixna)分子を特徴とし、ここで、化学的に修飾されたsixnaはセクス領域を含み、ここで、セクス領域中に存在する1またはそれ以上のポリシジンスクエロチド配列は2'-デオキシ-2'-フルオロポリリジンシススクエロチドであり(例えば、すべてのポリシジンスクエロチドが2'-デオキシ-2'-フルオロポリリジンシススクエロチドであるか、あるいは複数のポリシジンスクエロチドが2'-デオキシポリリンスクエロチドである)、またそれ以上のポリリンスクエロチド配列を含む(例えば、セクス領域中に存在する1またはそれ以上のポリリンスクエロチド配列は2'-デオキシポリリンスクエロチドであり(例えば、すべてのポリリンスクエロチドが2'-デオキシポリリンスクエロチドであるか、あるいは複数のポリリンスクエロチドが2'-デオキシポリリンスクエロチドである)、および、セクス領域の3'末端、5'末端または3'末端、および5'末端の両方に存在してもよい反転デオキシ無塩基修飾を含み、セクス領域はさらに約1〜約4個(例えば、約1, 2, 3, または4個)の2'-デオキ

オキシトリボスリデオチドを有する3'末端ホーバーハンドを含んでもよく、かつ、化学的に修飾された短干渉核酸分子はアンチセンス領域を含む。ここで、アンチセンス領域中に存在する1またはそれ以上のポリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルデオキシ-2'-アールオリゴポリミジンヌクレオチドであり（例えば、すべてのポリミジンヌクレオチドが2'-アールヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオリゴポリミジンヌクレオチドであるか、あるいは複数のポリミジンヌクレオチドは2'-メチルアリリンヌクレオチドであり（例えば、すべてのアリリンヌクレオチドは2'-O-メチルアリリンヌクレオチドであるか、あるいは複数のアリリンヌクレオチドが2'-O-メチルグリントヌクレオチドである）、および末端キップ修飾、例えば、本明細書に記載されるおまたたヌクレオチドを示されている）すべからぬ修飾を含む。これは任意に、アンチセンス配列の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方に存在してもよく、アンチセンス領域とはさらに任意に、約1-約4個（例えば、約1, 2, 3, または4個）の2'-デオキシヌクレオチドを有する3'末端ヌクレオチドホーバーハンドを含んでもよく、または4'ホーバーハンドヌクレオチドはさらに1またはそれ以上（例えば、1, 2, 3, または4個）のホルロチデオトリボヌクレオチド間結合を含むことができる。これらの化学的に修飾されたsiRNAの非限定的例は図4および5および本明細書の表I I IおよびIVに示される。

【6800】

1つの態様においては、本発明は、細胞の内部でまたは再構成されたインビトロ系にお

いて HIV に対する RNA 干渉 (RNAi) を媒介しうる本発明の化学的に修飾された短干渉核酸 (siNA) 分子を特徴とし、ここで、siNA はセクス領域を含み、ここで、セクス領域中に存在する 1 またはそれ以上のトリミジンスクオレオチドは、2'-デオキシ-2'-アルオロビリミジンスクオレオチドであり (例えば、すべてのトリミジンスクオレオチドが 2'-アルオロビリミジンスクオレオチドであるか、あるいは複数のトリミジンスクオレオチドが 2'-デオキシ-2'-アルオロビリミジンスクオレオチドである)、セクス領域中に存在する 1 またはそれ以上のアリンスクオレオチドはアリンスクオレオチドであり (例えば、すべてのアリンスクオレオチドがアリンスクオレオチドであるか、あるいは複数のアリンスクオレオチドがアリンスクオレオチドである)、およびセクス領域の 3' 末端、5' 末端、または 3' 末端および 5' 末端の両方に任意に存在していてもよい反転デオキシ無塩基修飾を含み、セクス領域はさらに任意に、約 1-約 4 個 (例えば、約 1, 2, 3, または 4 個) の 2'-デオキシリボススクオレオチドを有する 3' 末端オーバーハングを含み; かつ、siNA はアミンセクス領域を含み、ここで、アミンセクス領域中に存在する 1 またはそれ以上のトリミジンスクオレオチドは、2'-デオキシ-2'-アルオロビリミジンスクオレオチドであり (例えば、すべてのトリミジンスクオレオチドが 2'-アルオロビリミジンスクオレオチドであるか、あるいは複数のトリミジンスクオレオチドが 2'-デオキシ-2'-アルオロビリミジンスクオレオチドである)、アミンセクス領域中に存在する任意のアリンスクオレオチドは、2'-オメチルアリンスクオレオチドであり (例えば、すべてのアリンスクオレオチドが 2'-オメチルアリンスクオレオチドであるか、あるいは複数のアリンスクオレオチドが 2'-オメチルアリンスクオレオチドである)、および末端キヤップ修飾、例えば、本明細書に記載されるかまたは図 10 に示される任意の修飾を含み、これは任意にアミンセクス配列の 3' 末端、5' 末端、または 3' 末端および 5' 末端の両方に存在してもよく、アミンセクス領域はさらに任意に約 1-約 4 個 (例えば、約 1, 2, 3, または 4 個) の 2'-デオキシスクオレオチドを有する 3' 末端スクオレオチドオーバーハングを含んでもよく、ここで、オーバーハングがアミノアレオチドなら 1 またはそれ以上 (例えば、1, 2, 3, または 4 個) のホスホロアミノアレオチドなら 1 またはそれ以上 (例えば、1, 2, 3, または 4 個) のホスホロアミノアレオチド間結合を含むことができる。これらの化学的に修飾された siNA の非限定例は、図 4 および 5 および本明細書の表 I I および IV に示される。

【0090】

1 つの状態においては、本発明は、細胞の内部でまたは再構成されたインビトロ系において HIV に対する RNA 干渉 (RNAi) を媒介しうる本発明の化学的に修飾された短干渉核酸 (siRNA) 分子を特徴とし、化学的に修飾された siRNA はセンス領域を含み、ここで、センス領域中に存在する 1 またはそれ以上のポリミジンスクアレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロポリミジンスクアレオチドであり (例えば、すべてのポリミジンスクアレオチドが 2'-デオキシ-2'-フルオロポリミジンスクアレオチドであるか、あるいは複数のポリミジンスクアレオチドが 2'-デオキシ-2'-フルオロポリミジンスクアレオチドである)、例えば、センス領域中に存在する 1 またはそれ以上のポリンスクアレオチドは、2'-デオキシスルスカレオチド、ロウツ核酸 (LNA) スクアレオチド、2'-メトキシスルスカレオチド、4'-チオスルスカレオチド、4'-チオオキサスルスカレオチド、および 2'-オ-メチルスカレオチドからなる群より選択される (例えば、すべてのポリンスクアレオチドが 2'-デオキシスルスカレオチド、4'-チオスルスカレオチド、および 2'-オ-メチルスカレオチドからなる群より選択されるか、あるいは複数のポリンスクアレオチドが 2'-デオキシスルスカレオチド、ロウツ核酸 (LNA) スクアレオチド、2'-メトキシスルスカレオチド、4'-チオスルスカレオチド、および 2'-オ-メチルスカレオチドからなる群より選択される)、あるいは複数のポリンスクアレオチドが 2'-デオキシスルスカレオチド、ロウツ核酸 (LNA) スクアレオチド、2'-メトキシスルスカレオチド、4'-チオスルスカレオチド、および 2'-オ-メチルスカレオチドからなる群より選択される)、かつ、任意にセンス領域が存在し、または、5'末端、または 3'末端および 5'末端の両方に反転デオキシ無塩基修飾が存在し、または、センス領域はさらに任意に約 1-約 4 個 (例えば、約 1, 2, 3, または 4 個) の 2'-デオキシリボスルスカレオチドを有する 3'末端オーバーハングを含んでいてもよく、かつ、化学的に修飾された短干渉核酸分子はアンチセンス領域を含み、ここで、アンチセンス領域中に存在する 1 またはそれ以上のポリミジンスクアレオチドは

2. 一デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであり(例えば、すべてのピリミジンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであるか、あるいは複数のピリミジンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドである)、アミンチセンス領域中に存在する1またはそれ以上のアリヌクレオチド、2'-デオキシヌクレオチド、4'-デオキシヌクレオチド、および2'-O-メチルヌクレオチドからなる群より選択され(例えば、すべてのアリヌクレオチドが2'-デオキシヌクレオチド、ロウ糖核糖(LNA)ヌクレオチド、2'-メチルヌクレオチド、および2'-O-メチルヌクレオチドからなる群より選択される)、および2'-O-メチルヌクレオチドからなる群より選択される)、および未端キヤップアッザン、例えば、本明細書に記載されるかまたは図10に示されるいずれかの修飾を含み、これは任意にアミンチセンス配列の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方に存在しているてもよく、アミンチセンス領域はさらに任意に、約1-約4個(例えば、約1、2、3、または4個)の2'-デオキシヌクレオチドを有する3'末端ヌクレオチド、および1-約4個(例えば、約1、2、3、または4個)のホスホロチオエーヌヌクレオチド間結合を含むことができる。

別の提議においては、本発明の s i n A 分子中に存在する任意の修飾ヌクレオチドは、好ましくは、本発明の s i n A 分子のアンチセンス鎖に存在するが、また任意に、センスおよび/またはアンチセンス鎖とセンス鎖の両方に存在してもよく、これは、天然に生ずるリボヌクレオチドと類似する特性または特徴を有する修飾ヌクレオチドを含む。例えば、本発明は、ノザンコンプライメーション(例えば、ノザン塩回転サイクル、例えば、Saenger, Principles of Nucleic Acid Structure, Springer-Verlag ed., 1984を参照)を有する修飾ヌクレオチドを含む s i n A 分子を持続とする。このように、本発明の s i n A 分子中に存在する化学的に修飾されたヌクレオチドは、好ましくは、本発明の s i n A 分子のアンチセンス鎖に存在してもよく、または任意にセンスおよび/またはアンチセンス鎖およびセンス鎖の両方に存在してもよく、これはヌクレアゼ分断に対して耐性であると同時に R N A i を媒介する能力を維持する。ノザンコンプライメーションを有するヌクレオチドの非限定的例としては、ロツク核酸(LNA)ヌクレオチド(例えば、2'-O, 4'-C-アールチェン(Ｄ-リボフラノシル)ヌクレオチド；2'-メトキシエチル(ＭOE)ラウチオチド；2'-メチル-チオ-エチル、2'-デオキシ-2'-エチルオロヌクレオチド、2'-デオキシ-2'-クロロヌクレオチド、2'-アジドヌクレオチド、および2'-O-メチルヌクレオチドが挙げられる。

【0092】
1つの態様においては、本発明は、細胞の内部でまたは再構成されたインビトロ系においてH1Vに対するRNA干渉(RNAi)を媒介しうる化学的に修飾された短干渉核酸分子(s i N A)を特徴とし、ここで、化学的修飾は、化学的に修飾されたs i N A分子に共有結合したコンジュエートを含む。別の態様においては、コンジュエートは化学的に修飾されたs i N A分子に生物分解性リンカーを介して共有結合している。1つの態様において、コンジュエート分子は、化学的に修飾されたs i N A分子のセンス鎖、アンチセンス鎖、または両方に修飾されたs i N A分子のセンス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖の5'末端に結合している。さらに別の態様においては、コンジュエート分子は、化学的に修飾されたs i N A分子のセンス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖の5'末端に結合している。さらに別の態様においては、コンジュエート分子は、化学的に修飾されたs i N A分子の生物学的においては、本発明のコンジュエート分子は、化学的に修飾されたs i N A分子の生物学的

システム（例えば細胞）へのデリバリーを促進する分子を含む。別の態様においては、化学的に修飾された sRNA 分子に結合したコンジュゲート分子は、ポリエチレングリコール、ヒト血清アルブミン、または細胞取り込みを媒介することができる細胞シセプター分子である。化学的に修飾された sRNA 分子に結合させることができる、本発明により企図される特定のコンジュゲート分子の例は、Vargeeser (米国特許出願 0/201,394, 本明細書の一部としてここに引用) に記載される。用いられるコンジュゲートのタイプおよび本発明の sRNA 分子のコンジュゲーションの程度は、同時に sRNA が RNAi 活性を媒介する能力を維持しながら、sRNA コンストラクトの改良された薬物動態学プロファイル、生物利用性、および/または安定性について評価することができる。このように、当業者は、例えば、当該技術分野において一般的に知られる動物モデルにおいて、種々のコンジュゲートで修飾された sRNA コンストラクトをスクリーニングして、sRNA コンジュゲート複合体が RNAi を媒介する能力を維持しながら改良された特性を有するかを判定することができる。

1 つの態様においては、本発明は、s i N A がさらに s i N A のセンス領域と s i N A のアンチセンス領域とを連結させるヌクレオチド、非ヌクレオチド、または融合ヌクレオチド/非ヌクレオチドリボンカーを含む本発明の短干渉核酸 (s i N A) 分子を特徴とする。1 つの態様においては、本発明のヌクレオチドリボンカーは、2ヌクレオチド以上の長さ。例えば、3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, または 10ヌクレオチドの長さのリンカーである。本明細者において用いる場合、“アプター”または“核酸アプター”とは、標的分子に特異的に結合する核酸分子を意味し、ここで、核酸分子は、その天然の設定において標的分子により認識される配列を含む配列を有する。あるいは、アプターとは天然に核酸分子と結合しない標的分子に結合する核酸分子であってもよい。標的分子は目的とする任意のカ子でありうる。例えば、アプターを用いて蛋白質のリガンド結合ドメインに結合させ、このことにより、天然に生ずるリガンドと蛋白質との相互作用を妨害することができ、これは非限定的例であり、当業者は当該技術分野において一般に知られる手法を用いて他の態様を容易に生成しうることを認識するであろう (例えば、Gold et al., 1995, Annu. Rev. Biochem., 64, 763; Brody and Gold, 2000, J. Biotechnol., 74, 5; Sun, 2000, Ctr. Opin. Mol. Ther., 2, 100; Kusser, 2000, J. Biotechnol., 74, 27; Illeermann and Patel, 2000, Science, 287, 820; および Jayasena, 1999, Clinica Chemistry, 45, 1628を参照)。

さらに別の態様においては、本発明の非ヌクレオチドリソナーには、無塩基ヌクレオチド、ポリエーテル、ポリアミン、ポリアミド、ペプチド、炭水化物、脂質、ポリ酸化水素化、または他のポリマー性化合物（例えば、ポリエチレングリコール、例えば Seelaender, Kaiser, Nucleic Acids Res. 1990, 75: 63 and Schepartz, J. Am. Chem. Soc. 1991, 113: 63 および Nucleic Acids Res. 1987, 75: 3113; Cloarec and Schepartz, J. Am. Chem. Soc. 1991, 113: 63; Richardon and Schepartz, J. Am. Chem. Soc. 1991, 773: 5109; Ma et al., Nucleic Acids Res. 1993, 21: 2585 および Biochemistry 1993, 32: 1751; Durand et al., Nucleic Acids Res. 1991, 19: 75: 6353; McCurdy et al., Nucleosides & Nucleotides 1991, 10: 287; Jschke et al., Tetrahedron Lett. 1993, 34: 301; Ono et al., Biochemistry 1991, 30: 9914; Arnold et al., 国際公開

注する1またはそれ以上のポリミンヌクシオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロポリミンヌクシオチドであり(例えば、すべてのポリミンヌクシオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロポリミンヌクシオチドであるか、あるいは複数のポリミンヌクシオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロポリミンヌクシオチドである)、およびアノチセンス領域中に存在する任意のポリミンヌクシオチドは2'-メトキシエチルグリンスクシオチドであり(例えば、すべてのポリミンヌクシオチドが2'-メトキシエチルグリンスクシオチドであるか、あるいは複数のポリミンヌクシオチドが2'-メトキシエチルグリンスクシオチドであるか、および末端キヤップ修飾、例えば、本明細書に記載されるかまたは図10に示される任意の修飾を含み、これは任意にアノチセンス配列の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方に存在しているもよく、s i n Aはさらに任意に、s i n A分子の3'末端に約1-約4個(例えば、約1, 2, 3, または4個)の末端2'-デオキシヌクシオチドを含んでもよく、ここで末端ヌクシオチドはさらに1またはそれ以上(例えば、1, 2, 3, または4個)のホスホロチオエートヌクシオチド間結合を含むことができ、s i n Aはさらに任意に、末端リン酸基、例えば5'末端リン酸基を含むことができる。

【01011】別の態様においては、本発明の一本鎖s i n A分子中に存在する任意の修飾ヌクシオチドは、天然に生ずるリボヌクシオチドと類似する特性または特徴を有する修飾ヌクシオチドを含む。例えば、本発明は、ノザンコンゾメーション(例えば、ノザン転回転(pseudorotation)サイクル(例えば、Saenger, Principles of Nucleic Acid Structure, Springer-Verlag ed., 1984を参照)を有する修飾ヌクシオチドを含むs i n A分子を特徴とする。このように、本発明の一本鎖s i n A分子中に存在する化学的に修飾されたヌクシオチドは、好ましくは、ヌクレアーゼ分解に耐性であり、同時にRNAiを媒介する能力を維持する。

【0102】一つの態様においては、本発明は、細胞中においてHIV遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、(a)本発明のs i n A分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、s i n A鎖の一方はHIV遺伝子のRNAに相補的な配列を含み；そして(b)細胞中におけるHIV遺伝子の発現を調節するのに適した条件下でs i n A分子を細胞に導入することを含む。

【0103】一つの態様においては、本発明は、細胞中においてHIV遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、(a)本発明のs i n A分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、s i n A鎖の一方はHIV遺伝子のRNAに相補的な配列を含み、s i n Aのセンス鎖配列は標的RNAの配列と同一の配列を含み；そして(b)細胞中におけるHIV遺伝子の発現を調節するのに適した条件下でs i n A分子を細胞に導入することを含む。

【0104】別の態様においては、本発明は、細胞中において2以上のHIV遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、(a)本発明のs i n A分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、s i n A鎖の一方はHIV遺伝子のRNAに相補的な配列を含み；そして(b)細胞中におけるHIV遺伝子の発現を調節するのに適した条件下でs i n A分子を細胞に導入することを含む。

【0105】別の態様においては、本発明は、細胞中において2以上のHIV遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、(a)本発明のs i n A分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、s i n A鎖の一方はHIV遺伝子のRNAに相補的な配列を含み、s i n Aのセンス鎖配列は、標的RNAの配列と同一の配列を含み；そして(b)細胞中におけるHIV遺伝子の発現を調節するのに適した条件下でs i n A分子を細胞に導入することを含む。

【0106】一つの態様においては、本発明のs i n A分子は、エクソビオ用途において試薬として用いられる。例えば、治療効果のために被験者の中に移植される組織または細胞にs i n A試薬を導入する。細胞および/または組織は、その後、外植片を受ける生物または被験者由来であってもよく、移植前の別の生物または被験者由来であってもよい。s i n A分子を用いて、インビトロで移植された場合に細胞または組織が所望の表現型を獲得し、または機能を実行しようように、細胞または組織における1またはそれ以上の遺伝子の発現を調節することができる。一つの態様においては、ある種の標的細胞が患者から抽出される。これらの抽出細胞は、これらの細胞によるs i n Aの取込みに適した条件下で(例えば、カチオン性脂質、リポソーム等などのデリバリー試薬を用いて、またはエレクトロポレーションなどの方法を用いて、細胞へのs i n Aのデリバリーを促進することにより)、細胞内の特定のヌクシオチド配列を標的とするs i n Aと接触させる。次に、細胞を同じ患者または他の患者に再導入する。

【0107】一つの態様においては、本発明は、外植組織においてHIV遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、(a)本発明のs i n A分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、s i n A鎖の一方はHIV遺伝子のRNAに相補的な配列を含み；そして(b)外植組織中でHIV遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、s i n A分子を特定の生物に由来する外植組織の細胞に導入することを含む。別の態様においては、この方法はさらに、その生物においてHIV遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、外植組織をその組織が由来する生物に戻すか、または別の生物に導入することを含む。

【0108】一つの態様においては、本発明は、組織外植片においてHIV遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、(a)本発明のs i n A分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、s i n A鎖の一方はHIV遺伝子のRNAに相補的な配列を含み、s i n Aのセンス鎖配列は標的RNAの配列と同一の配列を含み；そして(b)組織外植片におけるHIV遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、s i n A分子を特定の生物に由来する組織外植片の細胞に導入することを含む。別の態様においては、この方法はさらに、その生物におけるHIV遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、組織外植片をその組織が由来する生物に戻すかまたは別の生物に導入することを含む。

【0109】別の態様においては、本発明は、組織外植片において2以上のHIV遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、(a)本発明のs i n A分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、s i n A鎖の一方はHIV遺伝子のRNAに相補的な配列を含み；そして(b)組織外植片におけるHIV遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、s i n A分子を特定の生物に由来する組織外植片の細胞に導入することを含む。別の態様においては、この方法はさらに、その生物におけるHIV遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、組織外植片をその組織が由来する生物に戻すかまたは別の生物に導入することを含む。

【0110】一つの態様においては、本発明は、生物においてHIV遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、(a)本発明のs i n A分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、s i n A鎖の一方はHIV遺伝子のRNAに相補的な配列を含み；そして(b)生物におけるHIV遺伝子の発現を調節するのに適した条件下でs i n A分子を生物に導入することを含む。

【0111】別の態様においては、本発明は、生物において2以上のHIV遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、(a)本発明のs i n A分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、s i n A鎖の一方はHIV遺伝子のRNAに相補的な配列を含み；そして(b)生物

クローニンガおよび/またはインビトロ系については転写、インビトロ系においては細胞発現により、得ることができる。

【0124】
1つの態様においては、本発明は、(a) 予め決定された複製性、例えば4^F(Nは、s i N Aコンストラクトの鎖のそれぞれにおいて塩基対形成したヌクレオチドの数を示し、例えば、19塩基対を有する21ヌクレオチドのセンス鎖およびアンチセンス鎖を有するs i N Aコンストラクトについては、複製性は4¹⁹となる)を有するランダム化されたs i N Aコンストラクトのライブラリを生成し、そして(b) 標的H I V RNA配列中のRNA i 標的領域を決定するのに適した条件下で、上述の(a)のs i N Aコンストラクトをアッセイする、各工程を含む方法の特徴とする。別の態様においては、(a)のs i N A分子は、固定された長さ、例えば約23ヌクレオチドの長さの鎖を含む。約19別の態様においては、(a)のs i N A分子は異なる長さのものであり、例えば、約19〜約25(例えば、約19、20、21、22、23、24、または25)ヌクレオチドの長さの鎖を有する。1つの態様においては、アッセイは、本明細書の実施例7に記載されるような、再構成されたインビトロs i N Aアッセイを含むことができる。別の態様においては、アッセイは、標的RNAが発現されている細胞培養系を含むことができる。別の態様においては、H I V RNAのフラグメントを、例えば、ゲル電気泳動、ノザンロット分析、またはRNAs e保護アッセイにより検出可能なレベルの切断について分析して、標的H I V RNA配列中の最も適当な標的領域を決定する。標的H I V RNA配列は、当該技術分野において知られるように、例えば、クローニンガおよび/またはインビトロ系については転写により、インビトロ系においては細胞発現により、得ることができる。

【0125】
別の態様においては、本発明は、(a) 標的遺伝子によりコードされるRNA i 標的の配列を分析し、(b) (a)のRNA i またはそれ以上の領域に相補的な配列を有する1またはそれ以上のs i N A分子の組を合成し、そして(c) 標的RNA配列中のRNA i 標的を決定するのに適した条件下で(b)のs i N A分子をアッセイする、各工程を含む方法の特徴とする。1つの態様においては、(b)のs i N A分子は、固定された長さ、例えば約23ヌクレオチドの長さの鎖を有する。別の態様においては、(b)のs i N A分子は、異なる長さ、例えば、約19〜約25(例えば、約19、20、21、22、23、24、または25)ヌクレオチドの長さの鎖を有する。1つの態様においては、アッセイは、本明細書に記載されるような再構成されたインビトロs i N Aアッセイを含んでもよい。別の態様においては、アッセイは、標的RNAが発現されている細胞培養系を含むことができる。標的RNAのフラグメントを、検出可能なレベルの切断について、例えばゲル電気泳動、ノザンロット分析、またはRNAs e保護アッセイにより分析して、標的RNA配列中の最も適当な標的領域を決定する。標的RNA配列は、当該技術分野において知られるようにして、例えば、クローニンガおよび/またはインビトロ系については転写により、インビトロ系においては細胞発現により、得ることができる。

【0126】
“標的部位”とは、アンチセンス領域中に標的配列に相補的な配列を含むs i N Aコンストラクトにより媒介される切断の“標的”とされる、標的RNA中の配列を意味する。

【0127】
“検出可能なレベルの切断”とは、標的RNAのランダム分解から生成するRNAのバックグラウンドから切断産物を識別するのに十分な程度の標的RNAの切断(および切断産物RNAの形成)を意味する。ほとんどの検出方法について、標的RNAの1〜5%から切断産物が生成すれば、バックグラウンドから検出するのに充分である。

【0128】
1つの態様においては、本発明は、化学的に修飾されていてもよい本発明のs i N A分子を薬学的に許容しうる担体または希釈剤中に含む組成物の特徴とする。別の態様においては、本発明は、1またはそれ以上の遺伝子を標的とし、化学的に修飾されていてもよい

本発明のs i N A分子を薬学的に許容しうる担体または希釈剤中に含む医薬組成物の特徴とする。別の態様においては、本発明は、被験者において疾病または健康状態の治療または予防する方法の特徴とし、該方法は、被験者における疾病または健康状態の治療または予防に適用した条件下で、被験者に本発明の組成物を単独または1またはそれ以上の他の治療用化合物と併用して投与することを含む。さらに別の態様においては、本発明は、被験者において組織拒絶を低減または予防する方法の特徴とし、該方法は、被験者における組織拒絶の低減または予防に適用した条件下で被験者に本発明の組成物を投与することを含む。

【0129】
別の態様においては、本発明は、H I V遺伝子標的を評価する方法の特徴とし、該方法は、(a) 本発明のs i N A分子を合成し、これは化学的に修飾されてもよく、s i N A鎖の一方はH I V標的遺伝子のRNAに相補的な配列を含み、(b) 細胞、組織、または生物においてH I V標的遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、s i N A分子を細胞、組織、または生物に導入し、そして(c) 細胞、組織、または生物における表現型変化をアッセイすることにより、遺伝子の機能を決定する、ことを含む。

【0130】
別の態様においては、本発明は、H I V標的を評価する方法の特徴とし、該方法は、(a) 本発明のs i N A分子を合成し、これは化学的に修飾されていてもよく、s i N A鎖の一方はH I V標的遺伝子のRNAに相補的な配列を含み、(b) 生物学的システムにおけるH I V標的遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、s i N A分子を生物学的システムに導入し、そして(c) 生物学的システムにおける表現型の変化をアッセイすることにより、遺伝子の機能を決定する、ことを含む。

【0131】
“生物学的システム”とは、生物起源、例えば、限定されないが、ヒト、動物、植物、昆虫、細菌、ウイルスまたは他の起源からの、複製されたまたは複製されていない形の物質を意味し、ここで、システムはRNA i 活性に必要な成分を含む。“生物学的システム”との用語には、例えば、細胞、組織、または生物、またはそれらの抽出物が含まれる。生物学的システムとの用語にはまた、インビトロの設定で用いることができる再構成されたRNA i 系が含まれる。

【0132】
“表現型変化”とは、本発明の核酸分子(例えばs i N A)との接触または処理にตอบสนองして生ずる任意の検出可能な細胞の変化を意味する。そのような検出可能な変化には、限定されないが、形状、サイズ、増殖、運動性、蛋白質発現またはRNA発現、または当該技術分野において知られる方法によりアッセイすることができる他の物理学的または化学的変化が含まれる。検出可能な変化にはまた、グリーン蛍光蛋白質(GFP)等のレポーター遺伝子/分子、または発現された蛋白質を同定するために用いられる種々のタグ、またはアッセイすることができる任意の他の細胞成分の発現が含まれる。

【0133】
1つの態様においては、本発明は、化学的に修飾されていてもよい本発明のs i N A分子を含有するキットを特徴とし、これは細胞、組織、または生物におけるH I V標的遺伝子の発現を調節するために用いることができる。別の態様においては、本発明は、化学的に修飾されていてもよい2以上の本発明のs i N A分子を含有するキットを特徴とし、これは細胞、組織、または生物において2以上のH I V標的遺伝子の発現を調節するために用いることができる。

【0134】
1つの態様においては、本発明は、化学的に修飾されていてもよい本発明の1またはそれ以上のs i N A分子を含有する細胞を特徴とする。別の態様においては、本発明のs i N A分子を含有する細胞は哺乳動物細胞である。さらに別の態様においては、本発明のs i N A分子を含有する細胞はヒト細胞である。

【0135】

1つの態様においては、化学的に修飾されていてもよい本発明の s i n A 分子の合成は、(a) s i n A 分子の2つの相補的鎖を合成し；(b) 二本鎖 s i n A 分子を得るのに適した条件下で2つの相補的鎖を一緒にアニーリングさせる、ことを含む。別の態様においては、s i n A 分子の2つの相補的鎖の合成は、固相オリゴヌクレオチド合成により行う。さらに別の態様においては、s i n A 分子の2つの相補的鎖の合成は、固相タンデムオリゴヌクレオチド合成により行う。

【0136】

1つの態様においては、本発明は、s i n A デュープレックス分子を合成する方法を特徴とし、該方法は、(a) s i n A 分子の第1のオリゴヌクレオチド配列鎖を合成し、ここで、第1のオリゴヌクレオチド配列鎖は s i n A の第2のオリゴヌクレオチド配列鎖の合成の足場として用いることができる切断可能なリンカー分子を含み；(b) 第1のオリゴヌクレオチド配列鎖の足場上で s i n A の第2のオリゴヌクレオチド配列鎖を合成し、ここで、第2のオリゴヌクレオチド配列鎖はさらに、s i n A デュープレックスを精製するために用いることができる化学成分を含み；(c) 2つの s i n A デュープレックス分子をリンカー分子を切断し；そして(d) 第2のオリゴヌクレオチド配列鎖の化学成分を利用して s i n A デュープレックスを精製する、の各工程を含む。1つの態様においては、上述の(c)におけるリンカー分子の切断は、オリゴヌクレオチドの脱保護の間に、例えば、メチルアミン等のアルキルアミン塩基を用いて加水分解条件下で行う。1つの態様においては、合成の方法は、調整多孔ガラス(CPG)またはポリスチレン等の固体支持体上での固相合成を含み、ここで、(a)の第1の配列は、固体支持体を足場として用いてスケニルリンカー等の切断可能なリンカー上で合成される。(a)において第2の鎖を合成するための足場として用いられる切断可能なリンカーは、固体支持体誘導化リンカーと(a)の切断可能なリンカーの切断が同時に行われるように、固体支持体誘導化リンカーと同様の反応性を有することができる。別の態様においては、結合したオリゴヌクレオチド配列の単離に用いることができる(b)の化学成分は、ジメトキシトリチル基等のトリチル基を含み、これは本明細書に記載されるトリチルオン合成戦略において利用することができる。さらに別の態様においては、ジメトキシトリチル基等の化学成分は、精製の間に、例えば脱水性条件を用いて除去する。

【0137】

さらに別の態様においては、s i n A 合成の方法は溶液相合成またはハイブリッド相合成であり、ここでは、第1の配列に結合され、第2の配列の合成の足場として作用する切断可能なリンカーを用いて、s i n A デュープレックスの両方の鎖をタンデムで合成する。別々の s i n A 配列鎖がハイブリダイズするのに適した条件下でリンカーを切断することにより、二本鎖 s i n A 分子が形成される。

【0138】

別の態様においては、本発明は、s i n A デュープレックス分子を合成する方法を特徴とし、該方法は、(a) s i n A 分子の一方のオリゴヌクレオチド配列鎖を合成し、ここで、配列は他方のオリゴヌクレオチド配列の合成の足場として用いることができる切断可能なリンカー分子を含み；(b) 第1の配列鎖に対して相補性を有する第2のオリゴヌクレオチド配列を(a)の足場上で合成し、ここで、第2の配列は二本鎖 s i n A の他方の鎖を含み、かつ、第2の配列はさらに、結合したオリゴヌクレオチド配列を単離するために用いることができる化学成分を含み；(c) 第2のオリゴヌクレオチド配列鎖の化学成分を利用して、切断可能なリンカーにより接続された両方の s i n A オリゴヌクレオチド鎖を含む全長配列を単離するのに適した条件下で、かつ、2つの s i n A オリゴヌクレオチド鎖がハイブリダイズして安定なデュープレックスを形成するのに適した条件下で、(b)の生成物を精製する、の各工程を含む。1つの態様においては、上述の(c)におけるリンカー分子の切断は、オリゴヌクレオチドの脱保護の間に、例えば加水分解条件下で行う。別の態様においては、上述の(c)におけるリンカー分子の切断は、オリゴヌクレオチドの脱保護の後に行う。別の態様においては、合成の方法は、調整多孔ガラス(CPG)またはポリスチレン等の固体支持体上での固相合成を含む、ここで、(a)の第1の配列は、スケニルリンカー等の切断可能なリンカー上で、固体支持体を足場として用いて合成する。(a)において第2の鎖を合成するための足場として用いられる切断可能なリンカーは、固体支持体誘導化リンカーと(a)の切断可能なリンカーの切断が同時に行われるように、固体支持体誘導化リンカーと同様の反応性を有することができる。別の態様においては、結合したオリゴヌクレオチド配列の単離に用いることができる(b)の化学成分は、ジメトキシトリチル基等のトリチル基を含み、これは本明細書に記載されるトリチルオン合成戦略において利用することができる。さらに別の態様においては、ジメトキシトリチル基等の化学成分は、精製の間に、例えば脱水性条件を用いて除去する。

CPG)またはポリスチレン等の固体支持体上での固相合成を含む、ここで、(a)の第1の配列は、スケニルリンカー等の切断可能なリンカー上で、固体支持体を足場として用いて合成する。(a)において第2の鎖を合成するための足場として用いられる切断可能なリンカーは、固体支持体誘導化リンカーおよび(a)の切断可能なリンカーが同時にまたは別々に切断されるように、固体支持体誘導化リンカーと同様の反応性または異なる反応性を有することができる。1つの態様においては、結合したオリゴヌクレオチド配列を単離するために用いることができる(b)の化学成分は、トリチル基、例えばジメトキシトリチル基を含む。

【0139】

別の態様においては、本発明は、1回の合成プロセスで二本鎖 s i n A 分子を作製する方法を特徴とし、該方法は、(a) 第1の配列および第2の配列を有するオリゴヌクレオチドを合成し、ここで、第1の配列は第2の配列に相補的であり、第1のオリゴヌクレオチド配列は切断可能なリンカーを介して第2の配列に連結されており、かつ、第2の配列を有するオリゴヌクレオチドには末端5'-保護基、例えば、5'-O-ジメトキシトリチル基(5'-O-DMT)が現存しており；(b) オリゴヌクレオチドを脱保護し、このことにより脱保護によって2つのオリゴヌクレオチド配列を結合しているリンカーが切断され；そして(c) 二本鎖 s i n A 分子を単離するのに適した条件下で、例えば本明細書に記載されるトリチルオン合成戦略を用いて、(b)の生成物を精製する、の工程を含む。

【0140】

別の態様においては、本発明の s i n A 分子の合成の方法は、Scarfireの米国特許5,889,136；6,008,400；および6,111,086(その全体を本明細書の一部としてここに引用する)の教示を含む。

【0141】

1つの態様においては、本発明はHIVに対するRNAiを媒介する s i n A コンストラクトを特徴とし、s i n A コンストラクトは、s i n A コンストラクトのヌクレオチド配列を増加させる1またはそれ以上の化学的修飾、例えば、式I-VIのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有する1またはそれ以上の化学的修飾を含む。

【0142】

別の態様においては、本発明は、ヌクレオチド配列が増加している s i n A 分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a) 式I-VIのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するヌクレオチドを s i n A 分子に導入し、そして(b)ヌクレオチド配列が増加している s i n A 分子を単離するのに適した条件下で工程(a)の s i n A 分子をアッセイする、ことを含む。

【0143】

1つの態様においては、本発明はHIVに対するRNAiを媒介する s i n A コンストラクトを特徴とし、s i n A コンストラクトは、s i n A コンストラクトのセンス鎖とアンチセンス鎖との間の結合親和性を調節する、1またはそれ以上の本明細書に記載される化学的修飾を含む。

【0144】

別の態様においては、本発明は、s i n A 分子のセンス鎖とアンチセンス鎖との間の結合親和性が増加している s i n A 分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a) 式I-VIのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するヌクレオチドを s i n A 分子に導入し、そして(b) s i n A 分子のセンス鎖とアンチセンス鎖との間の結合親和性が増加している s i n A 分子を単離するのに適した条件下で工程(a)の s i n A 分子をアッセイする、ことを含む。

【0145】

1つの態様においては、本発明は、HIVに対するRNAiを媒介する s i n A コンストラクトを特徴とし、s i n A コンストラクトは、s i n A コンストラクトのアンチセンス鎖と細胞中の相補的RNA配列との間の結合親和性を調節する本明細書に記載され

る1またはそれ以上の化学的修飾を含む。

[0146]

1つの態様においては、本発明は、HIVに対するRNAiを媒介するs i n a c o n s t r a c t を特徴とし、s i n a c o n s t r a c t は、s i n a c o n s t r a c t のアプテセンズ鎖と細胞中の相補的標的DNA配列との間の結合親和性を調節する本明細書に記載される1またはそれ以上の化学的修飾を含む。

[0147]

別の態様においては、本発明は、s i n a c o n s t r a c t と相補的標的RNA配列との間の結合親和性が増加しているs i n a c o n s t r a c t を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a)式I-VIのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するヌクレオチドをs i n a c o n s t r a c t に導入し、そして(b) s i n a c o n s t r a c t のアプテセンズ鎖と相補的標的RNA配列との間の結合親和性が増加しているs i n a c o n s t r a c t を同定するのに適した条件下で工程(a)のs i n a c o n s t r a c t をアッセイする、ことを含む。

[0148]

別の態様においては、本発明は、s i n a c o n s t r a c t と相補的標的DNA配列との間の結合親和性が増加しているs i n a c o n s t r a c t を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a)式I-VIのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するヌクレオチドをs i n a c o n s t r a c t に導入し、そして(b) s i n a c o n s t r a c t のアプテセンズ鎖と相補的標的DNA配列との間の結合親和性が増加しているs i n a c o n s t r a c t を単離するのに適した条件下で、工程(a)のs i n a c o n s t r a c t をアッセイする、ことを含む。

[0149]

1つの態様においては、本発明は、HIVに対するRNAiを媒介するs i n a c o n s t r a c t を特徴とし、s i n a c o n s t r a c t は、化学的に修飾されたs i n a c o n s t r a c t に対する配列ホモロジーを有する追加の内因性s i n a c o n s t r a c t を生成しうる細胞性ポリヌクレオチドのポリヌクレオチド活性を調節する、本明細書に記載される1またはそれ以上の化学的修飾を含む。

[0150]

別の態様においては、本発明は、化学的に修飾されたs i n a c o n s t r a c t に対して配列ホモロジーを有する追加の内因性s i n a c o n s t r a c t を生成しうる細胞性ポリヌクレオチドのポリヌクレオチド活性を増加することができるs i n a c o n s t r a c t を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a)式I-VIのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するヌクレオチドをs i n a c o n s t r a c t に導入し、そして(b)化学的に修飾されたs i n a c o n s t r a c t に対して配列ホモロジーを有する追加の内因性s i n a c o n s t r a c t を生成しうる細胞性ポリヌクレオチドのポリヌクレオチド活性を増加することができるs i n a c o n s t r a c t を単離するのに適した条件下で、工程(a)のs i n a c o n s t r a c t をアッセイする、ことを含む。

[0151]

1つの態様においては、本発明は、細胞においてHIVに対するRNAiを媒介する化学的に修飾されたs i n a c o n s t r a c t を特徴とし、ここで、化学的修飾は、そのようなs i n a c o n s t r a c t により媒介されるRNAiの効率を低下させるような様式で、s i n a c o n s t r a c t と標的RNA分子、DNA分子および/または蛋白質またはRNAiに必須の他の因子との相互作用に有意に影響を与えない。

[0152]

別の態様においては、本発明は、HIVに対する改良されたRNAi活性を有するs i n a c o n s t r a c t を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a)式I-VIのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するヌクレオチドをs i n a c o n s t r a c t に導入し、そして(b)改良されたRNAi活性を有するs i n a c o n s t r a c t を単離するのに適した条件下で、工程(a)のs i n a c o n s t r a c t をアッセイする、ことを含む。

[0153]

さらに別の態様においては、本発明は、HIV標的RNAに対する改良されたRNAi活性を有するs i n a c o n s t r a c t を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a)式I-VIの

いずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するヌクレオチドをs i n a c o n s t r a c t に導入し、そして(b)標的RNAに対する改良されたRNAi活性を有するs i n a c o n s t r a c t を単離するのに適した条件下で、工程(a)のs i n a c o n s t r a c t をアッセイする、ことを含む。

[0154]

さらに別の態様においては、本発明は、HIV標的DNAに対する改良されたRNAi活性を有するs i n a c o n s t r a c t を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a)式I-VIのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するヌクレオチドをs i n a c o n s t r a c t に導入し、そして(b)標的DNAに対する改良されたRNAi活性を有するs i n a c o n s t r a c t を単離するのに適した条件下で、工程(a)のs i n a c o n s t r a c t をアッセイする、ことを含む。

[0155]

1つの態様においては、本発明は、HIVに対するRNAiを媒介するs i n a c o n s t r a c t を特徴とし、ここで、s i n a c o n s t r a c t は、s i n a c o n s t r a c t の細胞取り込みを調節する本明細書に記載される1またはそれ以上の化学的修飾を含む。

[0156]

別の態様においては、本発明は、改良された細胞取り込みを有する、HIVに対するs i n a c o n s t r a c t を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a)式I-VIのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するヌクレオチドをs i n a c o n s t r a c t に導入し、そして(b)改良された細胞取り込みを有するs i n a c o n s t r a c t を単離するのに適した条件下で、工程(a)のs i n a c o n s t r a c t をアッセイする、ことを含む。

[0157]

1つの態様においては、本発明は、HIVに対するRNAiを媒介するs i n a c o n s t r a c t を特徴とし、ここで、s i n a c o n s t r a c t は、例えば、s i n a c o n s t r a c t の薬物動態を改良するポリエチレングリコールまたは同等のコンジュゲート等のポリマー性コンジュゲートを結合させることにより、またはインビトロで特定の組織のタイプまたは細胞のタイプにターゲティングするコンジュゲートを結合させることにより、s i n a c o n s t r a c t の生物利用性を増加させる、本明細書に記載される1またはそれ以上の化学的修飾を含む。そのようなコンジュゲートの非限定的例は、V a r g e e s e t a l . , 米国特許出願10/201,394 (本明細書の一部としてここに引用する)に記載されている。

[0158]

1つの態様においては、本発明は、改良された生物利用性を有する本発明のs i n a c o n s t r a c t を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a)コンジュゲートをs i n a c o n s t r a c t の構造中に導入し、そして(b)改良された生物利用性を有するs i n a c o n s t r a c t を単離するのに適した条件下で、工程(a)のs i n a c o n s t r a c t をアッセイする、ことを含む。そのようなコンジュゲートには、細胞シグナルのリガンド、例えば、天然に生ずる蛋白質リガンドに由来するペプチド；蛋白質局在化配列、例えば細胞ZLPコード配列；抗体；核酸アタック；ビタミンおよび他の補因子、例えば葉酸およびN-アセチルガラクトースアミン；ポリマー、例えばポリエチレングリコール(PEG)；リン脂質；ポリアミン、例えばスベルミンまたはスベルミジン；および他のものが含まれる。

[0159]

別の態様においては、本発明は、改良された生物利用性を有する本発明のs i n a c o n s t r a c t を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a)膜形成方をs i n a c o n s t r a c t に導入し、そして(b)改良された生物利用性を有するs i n a c o n s t r a c t を単離するのに適した条件下で、工程(a)のs i n a c o n s t r a c t をアッセイする、ことを含む。そのような膜形成には、ポリマー、例えばシクロデキストリン、脂質、カチオン性脂質、ポリアミン、リン脂質、およびその他のものが含まれる。

[0160]

別の態様においては、本発明は、改良された生物利用性を有する本発明のs i n a c o n s t r a c t を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a)式I-VIのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するヌクレオチドをs i n a c o n s t r a c t に導入し、そして(b)改良された

生物利用性を有する s i n A 分子を単離するのに適した条件下で工程 (a) の s i n A 分子をアッセイすることを含む。

[0161]

別の態様においては、本発明の s i n A 化合物にポリエチレングリコール (PEG) を共有結合的に結合させることができる。結合した PEG は、任意の分子量のものであってよく、好ましくは約 2,000-約 50,000 ダルトン (Da) である。

[0162]

本発明は、単独で、またはインビトロまたはインビボで RNA を試験サンプルおよび/または被験者に導入するのに必要な試薬の少なくとも一つを有するキットの成分として、用いることができる。例えば、キットの好ましい成分には、本発明の s i n A 分子、および本明細書に記載されるような、目的とする細胞内への s i n A の導入を促進するペプチルが含まれる (例えば、脂質および当該技術分野において知られる他のトランスフェクション法を用いる。例えば、Belgelman et al., 米国特許 6,395,713 を参照)。キットは、遺伝子機能および/または活性の決定において標的評価のために、または薬剤最適化において、および薬剤の発見において用いることができる (例えば、Usman et al., 米国特許出願 60/402,996 を参照)。そのようなキットはまた、キットのユーザが本発明を実施できるようにするための指針を含んでいるともよい。

[0163]

本明細書において用いる場合、“短干渉核酸”、“s i n A”、“短干渉 RNA”、“s i r N A”、“短干渉核酸分子”、“短干渉オリゴヌクレオチド分子”、または“化学的に修飾された短干渉核酸分子”との用語は、配列特異的模式で RNA 干渉 (“RNAi”) または遺伝子サイレンシングを媒介することにより遺伝子発現またはウイルス複製をダウンレギュレートする任意の核酸分子を表す (例えば、Bass, 2001, Nature 411, 428-429; Elbashir et al., 2001, Nature 411, 494-498; および Kreutzer et al., 国際公開 WO00/44895; Zernicka-Goetz et al., 国際公開 WO01/36446; Fire, 国際公開 WO99/32619; Plaut et al., 国際公開 WO00/01846; Mellor and Fire, 国際公開 WO01/29058; Deschamps-DePalmette, 国際公開 WO99/07409; および Li et al., 国際公開 WO00/44914; Alshire, 2002, Science, 297, 1818-1819; Volpe et al., 2002, Science, 297, 1833-1837; Jenwein, 2002, Science, 297, 2215-2218; および Hall et al., 2002, Science, 297, 2232-2237; Hutvagner and Zamore, 2002, Science, 297, 2056-60; McManus et al., 2002, RNA, 8, 842-850; Reinhart et al., 2002, Gene & Dev., 16, 1616-1626; および Reinhart & Bartel, 2002, Science, 297, 1831 を参照)。本発明の s i n A 分子の非限定的例は、図 4-6 および本明細書の表 11, 111 および 11V に示される。例えば、s i n A は、自己相補的なセンス領域およびアンチセンス領域を含む二本鎖オリゴヌクレオチド分子であってもよく、ここで、アンチセンス領域は標的核酸配列またはその一部に対応するヌクレオチド配列を有する。s i n A は 2 つの別々のオリゴヌクレオチドから組み立てることができる。ここで一方の鎖はセンス鎖であり、他方はアンチセンス鎖であり、アンチセンス鎖およびセンス鎖は自己相補的であり (すなわち、アンチセンス鎖とセンス鎖とがデュアルペアを形成し、例えば、二本鎖領域は約 19 塩基対である) ; アンチセンス鎖は標的核酸分子またはその一部のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含み、センス鎖は標的核酸配列またはその一

部に対応するヌクレオチド配列を含む。あるいは、s i n A は単一のオリゴヌクレオチドから組み立ててもよく、ここで、s i n A の自己相補的センス領域およびアンチセンス領域は、核酸系または非核酸系のリンカーにより連結されている。s i n A は、自己相補的センス領域およびアンチセンス領域を有するヘアピン二次構造を有するポリヌクレオチドであってもよく、ここで、アンチセンス領域は別の標的核酸分子またはその一部のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含み、センス領域は、標的核酸配列またはその一部に対応するヌクレオチド配列を有する。s i n A は 2 またはそれ以上のルーブリック構造および自己相補的センス領域およびアンチセンス領域を含む入子構造を有する環状一本鎖オリゴヌクレオチドであってもよく、ここで、アンチセンス領域は標的核酸配列またはその一部のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含み、センス領域は標的核酸配列またはその一部に対応するヌクレオチド配列を有し、環状ポリヌクレオチドは、インビトロまたはインビボでアッセイされて、RNAi を媒介しうる活性な s i n A 分子を生ずることができる。s i n A はまた、標的核酸分子またはその一部のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を有する一本鎖ポリヌクレオチドまたはその一部に対応するヌクレオチド配列を有する一本鎖ポリヌクレオチドはさらに末端リン酸基、例えば 5'-リン酸 (例えば、Martinez et al., 2002, Molecular Cell, 10, 537-568 を参照)、または 5', 3', 2'-リン酸を含んでもよい。ある態様においては、本発明の s i n A 分子は、別々のセンスおよびアンチセンス配列または領域を含んでもよく、センスおよびアンチセンス領域は、当該技術分野において知られるヌクレオチドまたは非ヌクレオチドリンカン分子により共有結合により結合しているか、あるいは、イオン相互作用、水素結合、フッペルワールス相互作用、疎水の相互作用、および/またはスタッキング相互作用により非共有結合的に結合している。ある態様においては、本発明の s i n A 分子は、標的遺伝子のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含む。別の態様においては、本発明の s i n A 分子は、標的遺伝子の発現の阻害を引き起こせるように、標的遺伝子のヌクレオチド配列と相互作用する。本明細書において用いる場合、s i n A 分子は RNA のみを含む分子に限定される必要はなく、化学的に修飾されたヌクレオチドおよび非ヌクレオチドも包含する。ある態様においては、本発明の短干渉核酸分子は 2'-ヒドロキシ (2'-OH) を含むヌクレオチドを欠失している。本出願人は、ある態様において、RNAi を媒介するために 2'-ヒドロキシ基を有するヌクレオチドの存在を必要としない短干渉核酸を記載する。すなわち、本発明の短干渉核酸分子は、任意にリボヌクレオチド (例えば、2'-OH を有するヌクレオチド) を含まなくてもよい。しかし、RNAi を支持するために s i n A 分子中にリボヌクレオチドの存在を必要としないそのような s i n A 分子は、2'-OH を有する 1 またはそれ以上のヌクレオチドを含む、結合したリンカまたは他の結合しているかまたは会合している基、成分、または鎖を有することができる。任意に、s i n A 分子は、ヌクレオチド位置の約 5, 10, 20, 30, 40, または 50 % にリボヌクレオチドを含むことができる。本発明の修飾短干渉核酸分子または、短干渉修飾オリゴヌクレオチド “s i m o n” と称される。本明細書において用いる場合、s i n A の用語は、配列特異的な RNAi を媒介しうる核酸分子を記述するために用いられる他の用語、例えば、短干渉 RNA (s i r N A) 、二本鎖 RNA (dsRNA) 、マイクロ RNA (miRNA) 、短ヘアピン RNA (shRNA) 、短干渉オリゴヌクレオチド、短干渉核酸、短干渉修飾オリゴヌクレオチド、化学的に修飾された s i r N A 、転写後遺伝子サイレンシング RNA (piRNA) 、および他のものと同等であることの意味する。さらに、本明細書において用いる場合、RNAi の用語は、配列特異的な RNA 干渉を記述する他の用語、例えば転写後遺伝子サイレンシング、または後成遺伝子 (c p i c o n c i l s) と同等であることを意味する。例えば、本発明の s i n A 分子を用いて、転写後レベルまたは転写前レベルの両方で後成的に遺伝子サイレンシングさせることができる。非限定的例においては、本発明の s i n A 分子による遺伝子発現の後

成的制御は、クロマチン構造の *sina* 媒介性修飾により生じて遺伝子発現を変化させることができる(例えば, *Alshire*, 2002, *Science*, 297, 1818-1819; *Voipe et al.*, 2002, *Science*, 297, 1833-1837; *Jenuwein*, 2002, *Science*, 297, 2215-2218; および *Hall et al.*, 2002, *Science*, 297, 2232-2237 を参照)。

【0164】

“調節する”とは、遺伝子の発現、または1またはそれ以上の蛋白質または蛋白質サブユニットをコードするRNA分子または同等のRNA分子のレベル、または蛋白質または蛋白質サブユニットの1またはそれ以上の活性が、発現、レベル、または活性が、調節剤の非存在下で観察されるより高いかまたは低いように、アッソシエートまたはアッソシエートされ、これを意味する。例えば、“調節する”の用語は、“阻害する”ことを意味しうるが、“調節する”の用語の使用はこの定義には限定されない。

【0165】

“阻害する”、“アッソシエートする”、または“減少させる”とは、遺伝子の発現、または1またはそれ以上の蛋白質または蛋白質サブユニットをコードするRNA分子または同等のRNA分子のレベル、または1またはそれ以上の蛋白質または蛋白質サブユニットの活性が、本発明の核酸分子(例えば *sina*) の非存在下において観察されるより低く減少していることを意味する。1つの態様においては、*sina* 分子による阻害、アッソシエーションまたは低下は、ス克蘭化配列を有するカミヌアツチを有する *sina* 分子の存在下で観察されるレベルより低い。別の態様においては、*sina* 分子による阻害、アッソシエーション、または低下は、例えば、ス克蘭化配列を有するカミヌアツチを有する *sina* 分子の存在下で観察されるレベルより低い。別の態様においては、本発明の核酸分子による遺伝子発現の阻害、アッソシエーション、または低下は、核酸分子の存在下においてその非存在下におけるより大きい。

【0166】

“遺伝子”または“標的遺伝子”とは、RNA をコードする核酸を意味し、例えば、限定されないが、ポリペプチドをコードする構造遺伝子などの核酸配列が含まれる。標的遺伝子は、細胞に由来する遺伝子、内因性遺伝子、トランスジ、または外来遺伝子、例えば、病原体(例えばウイルス)の感染後に細胞中に存在する病原体の遺伝子でありうる。標的遺伝子を含む細胞は、任意の生物、例えば、植物、動物、原生動物、ウイルス、細菌または真菌に由来するかその中に含まれる。植物の非限定的例には、単子葉植物、双子葉植物、または裸子植物が含まれる。動物の非限定的例には脊椎動物または無脊椎動物が含まれる。真菌の非限定的例には糸状菌または酵母が含まれる。

【0167】

本明細書において用いる場合、“HIV”とは、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染および後天性免疫不全症候群(AIDS)の進行、発達、または維持に関与する任意のウイルス、蛋白質、ペプチド、ポリペプチド、および/またはポリヌクレオチドを意味し、HIV 遺伝子から発現されるもの、またはHIV 感染に関与するもの(例えば、本明細書において *Gibbon* 受託番号で参照されるポリヌクレオチドまたはHIV 遺伝子由来する他の任意のHIV 転写産物)を含む、例えば、ウイルス全体、例えば、HIV-1、HIV-2、HIV-1、SIV-1、SIV-1; ウイルス成分、例えば、*nef*, *vif*, *tat*, または *rev* ウイルス遺伝子産物; およびHIV 感染に関与する細胞標的が含まれる。

【0168】

“HIV 蛋白質”とは、任意のHIV ペプチドまたは蛋白質またはそれらの成分を意味し、ここで、ペプチドまたは蛋白質は、HIV 遺伝子によりコードされるか、またはHIV 活性を有する。

【0169】

“高度に保存された配列領域”とは、標的遺伝子中の1またはそれ以上の領域のヌクレオ

50

チド配列が、1つの世代と他の世代とで、または1つの生物学的システムと他の生物学的システムとで有意に相違しないことを意味する。

【0170】

“センス領域”とは、*sina* 分子のアンチセンス領域に対する相補性を有する、*sina* 分子のヌクレオチド配列を意味する。さらに、*sina* 分子のセンス領域は、標的核酸配列とホモロジーを有する核酸配列を含むことができる。

【0171】

“アンチセンス領域”とは、標的核酸配列に対する相補性を有する、*sina* 分子のヌクレオチド配列を意味する。さらに、*sina* 分子のアンチセンス領域は、*sina* 分子のセンス領域に対する相補性を有する核酸配列を任意に含むことができる。

【0172】

“標的核酸”とは、その発現または活性が調節されるべき任意の核酸配列を意味する。標的核酸はDNA またはRNA でありうる。

【0173】

“相補性”とは、核酸が、伝統的なアトソニックリットクまたは他の非伝統的なタインのいずれかにより、別の核酸配列と水素結合を形成しうることを意味する。本発明の核酸分子に関して、核酸分子とその相補的配列との結合自由エネルギーは、核酸の適切な機能、例えば、RNAi 活性を進行させるのに十分なものである。核酸分子についての結合自由エネルギーの決定は当該技術分野においてよく知られている(例えば、*Turner et al.*, 1987, *CSH Symp. Quant. Biol.*, 11 pp. 123-133; *Frier et al.*, 1986, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 83: 9373-9377; *Turner et al.*, 1987, *J. Am. Chem. Soc.*, 109: 3783-3785 を参照)。相補性のパーセンテージは、核酸分子中の、第2の核酸配列と水素結合(例えば、アトソニック塩基対形成)を形成しうる連続する残基のパーセンテージを示す(例えば、10塩基中の5、6、7、8、9、10塩基は、50%、60%、70%、80%、90%、および100%の相補性である)。“完全な相補性”とは、核酸配列の連続する残基がすべて第2の核酸配列中の同じ数の連続する残基と水素結合を形成しうることを意味する。

【0174】

本発明の *sina* 分子は、単独でまたは他の治療法と組み合わせ、種々の病理性感染症または他の病気、例えば、HIV 感染または後天性免疫不全症候群(AIDS)、および細胞または組織におけるHIV のレベルに関連する他の任意の疾病または病気を治療するための新規な治療方法である。HIV 発現(特にHIV RNA レベル)の減少、したがって、それぞれの蛋白質のレベルの減少は、疾病または病気の症状をある程度軽減する。

【0175】

本発明の1つの態様においては、本発明の *sina* 分子の各配列は、独立して、約18-約24ヌクレオチドの長さであり、特定の態様においては、約18、19、20、21、22、23、または24ヌクレオチドの長さである。別の態様においては、本発明の *sina* デュプレックスまたは24ヌクレオチドの長さである。約17-約23(例えば、約17、18、19、20、21、22または23)塩基対を含む。さらに別の態様においては、ヘアピンまたは環状構造を含む本発明の *sina* 分子は、約35-約55(例えば、約35、40、45、50または55)ヌクレオチドの長さであるか、または約38-約44(例えば、約38、39、40、41、42、43または44)ヌクレオチドの長さであり、約16-約22(例えば、約16、17、18、19、20、21または22)塩基対を含む。本発明の例示的 *sina* 分子は本明細書に開示される。本発明の例示的合成 *sina* 分子は、表1 I I およびIV、および/または図4-5に示される。

【0176】

本明細書において用いる場合、“細胞”は、その通常の生物学的意味で用いられ、多細胞生物全体を指さず、特にヒトを指さない。細胞は生物中で、例えば、鳥類、植物および哺

50

乳動物、例えばヒト、ウシ、ヤギ、無尾サル、有尾サル、フタ、イヌおよびネコ中で存在することができ、細胞は、原核生物（例えば細菌細胞）または真核生物（例えば哺乳動物または植物細胞）であってもよい。細胞は体細胞起源でも生殖細胞系起源でもよく、全能細胞でも多能性細胞でもよく、分裂していても分裂していてもよい。細胞はまた、配偶子または胚、幹細胞、または完全に分化した細胞に由来するか、またはこれらを含むものであってもよい。

[0177] 本発明の s i n A 分子は、直接加えてもよく、またはカチオン性脂質と複合体化して、リポソーム中に封入して、または他の方法により、標的細胞または組織にデリバリーすることができ、核膜または核被膜複合体は、関連する組織にエクスポートで、または注射、注入ポンプまたはスポンジを用いてインジェクションで、バイオポリマー中に取り込ませてまたは取り込ませずに、局所的に投与することができ、特定の組織においては、本発明の核酸分子は表 1-11 および/または図 4-5 に示される配列を含む。そのような核酸分子の例は、これらの表および図面において規定される配列から本質的になる。さらに、表 1 に記載される化学的に修飾されたコンストラクトを本発明の任意の s i n A 配列に適用することができ。

[0178] 別の観点においては、本発明は本発明の 1 またはそれ以上の s i n A 分子を含む哺乳動物細胞を提供する。1 またはそれ以上の s i n A 分子は、独立して、同じまたは異なる部位を標的とすることができ。

[0179] "RNA"とは、少なくとも 1 つのリボヌクレオチド残基を含む分子を意味する。"リボヌクレオチド"とは、 β -D-リボフuranose 成分の 2' 位にヒドロキシル基を有するヌクレオチドを意味する。この用語は、二本鎖 RNA、一本鎖 RNA、単離された RNA、例えば部分的に生成された RNA、本質的に純粋な RNA、合成 RNA、組織学的に製造された RNA、ならびに 1 またはそれ以上のヌクレオチドの付加、欠失、置換および/または変更により、天然に生ずる RNA と異なるように変更された RNA を含む。そのような変更は、非ヌクレオチド物質の付加、例えば、s i n A の末端または内部（例えば RNA の少なくとも 1 またはそれ以上のヌクレオチド）への付加を含むことができる。本発明の RNA 分子中のヌクレオチドはまた、標準的ではないヌクレオチド、例えば、天然に生じないヌクレオチドまたは化学的に合成されたヌクレオチドまたはデオキシヌクレオチドを含むことができる。これらの変更された RNA は、類似体または天然に生ずる RNA の類似体と称することができる。

[0180] "被験者"とは、外植された細胞の DNA またはレジンジェントである生物または細胞それ自体を意味する。"被験者"とはまた、本発明の核酸分子を投与することができる生物を表す。1 つの態様においては、被験者は哺乳動物または哺乳動物細胞である。別の態様においては、被験者はヒトまたはヒト細胞である。

[0181] 本明細書において用いる場合、"ホスホロチオエート"との用語は、式 I（式中、Z および/または W はイオン原子を含む）を有するヌクレオチド間結合を表す。したがって、ホスホロチオエートとの用語は、ホスホロチオエートおよびホスホロジチオエートヌクレオチド間結合の両方を表す。

[0182] 本明細書において用いる場合、"万能塩基"との用語は、天然の DNA/RNA 塩基のそれと、これらをはほとんど区別せずに塩基対を形成するヌクレオチド塩基類似体を表す。万能塩基の非限定的例としては、当該技術分野において知られるように（例えば、L o a k e s, 2001, N u c l e i c A c i d s R e s e a r c h, 29, 2437, 2447 を参照）、C-アミノ基、C-アミノ基および他の芳香族誘導体、イノシン、アゾールカルボキサミド、およびニトロアゾール誘導体、例えば、3-ニトロピロール、

4-ニトロインドル、5-ニトロインドル、および 6-ニトロインドルが挙げられる。

[0183] 本明細書において用いる場合、"非環状ヌクレオチド"との用語は、非環状リボース糖を有する任意のヌクレオチド、例えば、リボース炭素 (C1, C2, C3, C4, または C5) のいずれかが、独立してまたは組み合わせてヌクレオチド中に存在しないヌクレオチドを表す。

[0184] 本発明の核酸分子は、個別に、または他の薬剤と組み合わせるまたは一緒に、本明細書に記載される疾病または状態（例えば癌および他の増殖性疾患）を治療するために用いることができる。例えば、特定の疾病または状態を治療するために、治療に適した条件下で、s i n A 分子を個別にまたは 1 またはそれ以上の薬剤と組み合わせる被験者に投与することができ、または当業界には明らかな他の適当な細胞に投与することができる。

[0185] さらに別の態様においては、s i n A 分子を他の既知の治療法と組み合わせる用いて、上述の健康状態または疾病を治療することができる。例えば、本明細書に記載される分子を 1 またはそれ以上の既知の治療法と組み合わせる用いて、疾病または健康状態を治療することができる。本発明の s i n A 分子と容易に組み合わせることができる他の治療法の非限定的例は、酵素的核酸分子、アミノ酸核酸分子、アミンセノス、デコイ、またはアプタマー核酸分子、抗体、例えばモノクローナル抗体、小分子、および他の有機および/または無機化合物、例えば金属、塩およびイオンである。

[0186] 1 つの態様においては、本発明は、本発明の少なくとも 1 つの s i n A 分子をコードする核酸配列を、その s i n A 分子の発現を可能にするように含む発現ベクターを特徴とする。例えば、ベクターは、デューアプレックスを含む s i n A 分子の両方の鎖をコードする配列を含むことができる。ベクターはまた、自己相補的でありしたがって s i n A 分子を形成する 1 つの核酸分子をコードする配列を含むことができる。そのような発現ベクターの非限定的例は、Paul et al., 2002, Nature Biotechnology, 19, 505; Miyagishi and Taira, 2002, Nature Biotechnology, 19, 497; Lee et al., 2002, Nature Biotechnology, 19, 500; および Novina et al., 2002, Nature Medicine, 8, 681-686 に記載されている。

[0187] 別の態様においては、本発明は、本発明の発現ベクターを含む哺乳動物細胞、例えば、ヒト細胞を特徴とする。

[0188] さらに別の態様においては、本発明の発現ベクターは、Genbank 受託番号、例えば本明細書に開示される Genbank 受託番号で表される RNA 分子に対する相補性を有する s i n A 分子の配列を含む。

[0189] 1 つの態様においては、本発明の発現ベクターは、2 またはそれ以上の s i n A 分子をコードする核酸配列を含み、これらは同じであっても異なってもよい。

[0190] 本発明の別の観点においては、標的 RNA 分子と相互作用して、標的 RNA 分子（例えば、本明細書において Genbank 受託番号で表される標的 RNA 分子）をコードする遺伝子をダウンレギュレートする s i n A 分子は、DNA または RNA ベクター中に挿入された転写ユニットから発現される。置換えベクターは、DNA プラスミドまたはウイルスベクターでありうる。s i n A を発現するウイルスベクターは、限定されないが、アデノウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、またはアルファウイルスに基づいて

検疫することができ、s i N A分子を発現しうる組換えベクターは、本明細書に記載されるようにデリバリーされ、標的細胞中に発現する。あるいは、s i N A分子の過剰的発現を与えるウイルスベクターを用いることもできる。そのようなベクターは、必要に応じて繰り返し投与することができる。いったん発現されれば、s i N A分子は結合してRNA干渉(RNAi)により遺伝子機能または発現をダウンレギュレートする。s i N Aを発現するベクターのデリバリーは、全身的(例えば、静脈内または筋肉内投与により)、被験者から外観された標的細胞に投与した後、被験者に再導入することにより、または所望の標的細胞中への導入を可能とする他のいずれかの手段により行うことができる。

【0191】

“ベクター”とは、所望の核酸をデリバリーするために用いられる、任意の核酸および/またはウイルスに基づく手法を意味する。

【0192】

本発明の他の特徴および利点は、以下の本発明の好ましい態様の説明および特許請求の範囲から明らかである。

【発明を実施するための最良の形態】

【0193】

図面の簡単な説明

図1は、s i N A分子を合成するスキームの非限定的例を示す。相補的s i N A配列鎖である鎖1および鎖2をタンデムで合成し、切断可能な結合、例えばヌクレオチドスナックネットまたは無塩基スナックネットで結合させる。これは、固体支持体上の固相合成において用いられる切断可能なリンカーと同じであっても異なっている。合成は固相でも液相でもよく、示される例においては合成は固相合成である。合成は、タンデムオリゴヌクレオチドの末端ヌクレオチド上にジメトキシトリチル基等の保護基が現れるように実施する。オリゴヌクレオチドを切断および脱保護するため、末端保護基の性質を利用してデユエーリングを精製することができる。これは、例えば、末端保護基を有するデユエーリングス/オリゴヌクレオチドのみが単離されるトリチルオン精製法を適用することにより行うことができる。

【0194】

図2は、本発明の方法により合成された精製s i N AデユエーリングスのMALDI-TOF質量分析を示す。示される2つのピークは、別々のs i N A配列鎖の推定質量に対応する。この結果は、タンデム合成から生成されたs i N Aデユエーリングスを、単純なトリチルオン精製方法論を用いて単一物質として精製しうることを示す。

【0195】

図3は、RNAiに關与する標的RNA分解の提唱されるメカニズムの非限定的例を示す図である。外來一本鎖RNA、例えばウイルス、トランスポゾン、または他の外因性RNAからRNA依存性RNAポリメラーゼ(RDRP)により生成される二本鎖RNA(dsRNA)が、ダイサー(DICER)酵素を活性化し、次にこれはs i N Aデユエーリングスを生成する。あるいは、合成されたまたは発現されたs i N Aを適当な手段により細胞内に直接導入することができる。活性なs i N A複合体が形成され、これは標的RNAを認識し、その結果、RISCエンブレマーズ複合体により標的RNAが分解されるか、またはRNA依存性RNAポリメラーゼ(RDRP)により追加のRNAが合成され、これはダイサーを活性化して追加のs i N A分子が生じ、このことによりRNAi応答が増幅される。

【0196】

図4A-Fは、本発明の化学的に修飾されたs i N Aコンストラクトの非限定的例を示す。図中、Nは任意のヌクレオチド(アデニン、グアニン、シトシン、ウリジン、または任意にチミン)を表し、例えば、括弧(NN)により表されるオーバーハング領域においてチミンジンを置換されていてもよい。s i N Aコンストラクトのセンス鎖およびアンチセンス鎖について種々の修飾が示されている。

【0197】

図4A: センス鎖は、4個のホスホロチオエート5'、および3'、末端ヌクレオチド間結合を有する21ヌクレオチドを含み、ここで、2つの末端3'、ヌクレオチドは任意に塩基対形成してもよく、存在しうるすべてのピリミジンヌクレオチドは(NN)ヌクレオチドを除き2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドであり、これはリボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、万能塩基、または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができる。アンチセンス鎖は21ヌクレオチドを含み、任意に3'、末端グリセリル成分を有していることもよく、ここで、2個の末端3'、ヌクレオチドは任意に標的RNA配列に相補的であってもよく、1個の3'、末端ホスホロチオエートヌクレオチド間結合および4個の5'、末端ホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有していることもよく、存在しうるすべてのピリミジンヌクレオチドは(NN)ヌクレオチドを除き2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドであり、これはリボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、万能塩基、または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができる。

【0198】

図4B: センス鎖は21ヌクレオチドを含み、ここで、2個の末端3'、ヌクレオチドは、任意に塩基対形成してもよく、存在しうるすべてのピリミジンヌクレオチドは(NN)ヌクレオチドを除き2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドであり、これはリボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、万能塩基、または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができる。アンチセンス鎖は21ヌクレオチドを含み、任意に3'、末端グリセリル成分を有していることもよく、ここで、2個の末端3'、ヌクレオチドは、任意に標的RNA配列に相補的であってもよく、存在しうるすべてのピリミジンヌクレオチドは(NN)ヌクレオチドを除き2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドであり、これはリボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、万能塩基、または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができる。

【0199】

図4C: センス鎖は5'、末端キヤップ成分および3'、末端キヤップ成分を有する21ヌクレオチドを含み、ここで、2個の末端3'、ヌクレオチドは任意に塩基対形成しているもよく、存在しうるすべてのピリミジンヌクレオチドは(NN)ヌクレオチドを除き2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドであり、これはリボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、万能塩基、または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができる。アンチセンス鎖は、21ヌクレオチドを含み、任意に3'、末端グリセリル成分を有しているもよく、ここで、2個の末端3'、ヌクレオチドは任意に標的RNA配列に相補的であってもよく、1個の3'、末端ホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有しているもよく、存在しうるすべてのピリミジンヌクレオチドは(NN)ヌクレオチドを除き2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドであり、これはリボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、万能塩基、または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができる。

【0200】

図4D: センス鎖は5'、末端キヤップ成分および3'、末端キヤップ成分を有する21ヌクレオチドを含み、ここで、2個の末端3'、ヌクレオチドは任意に塩基対形成してもよく、存在しうるすべてのピリミジンヌクレオチドは(NN)ヌクレオチドを除き2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドであり、これはリボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、万能塩基、または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができる。アンチセンス鎖は21ヌクレオチドを含み、これは任意に3'、末端グリセリル成分を有しているもよく、ここで、2個の末端3'、ヌクレオチドは任意に標的RNA配列に相補的であってもよく、1個の3'、末端ホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有しているもよく、存在しうるすべてのピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドであり、存在しうるすべてのピリミジンヌクレオチドは(NN)ヌクレオチドを除き2

、一オームチル修飾ヌクレオチドであり、これはリボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、万能塩基、または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができる。

[0201]

図4E：センス鎖は5'末端キヤップ成分および3'末端キヤップ成分を有する21ヌクレオチドを含み、ここで、2個の末端3'-ヌクレオチドは任意に塩基対形成してもよく、存在しうるすべてのポリヌクレオチドは(NN)ヌクレオチドを除き2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドであり、これは、リボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、万能塩基、または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができる。アンチセンス鎖は21ヌクレオチドを含み、任意に3'末端グリセリル成分を有しているてもよく、ここで、2個の末端3'-ヌクレオチドは任意に標的RNA配列に相補的であつてもよく、存在しうるすべてのポリヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドであり、存在しうるすべてのポリヌクレオチドは(NN)ヌクレオチドを除き2'-オームチル修飾ヌクレオチドであり、これは、リボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、万能塩基、または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができる。

[0202]

図4F：センス鎖は5'末端キヤップ成分および3'末端キヤップ成分を有する21ヌクレオチドを含み、ここで、2個の末端3'-ヌクレオチドは任意に塩基対形成してもよく、存在しうるすべてのポリヌクレオチドは(NN)ヌクレオチドを除き2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドであり、これはリボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、万能塩基、または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができる。アンチセンス鎖は21ヌクレオチドを含み、任意に3'末端グリセリル成分を有しているてもよく、ここで、2個の末端3'-ヌクレオチドは任意に標的RNA配列に相補的であつてもよく、1個の3'末端ホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有しているてもよく、存在しうるすべてのポリヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドであり、存在しうるすべてのポリヌクレオチドは(NN)ヌクレオチドを除き2'-デオキシヌクレオチドであり、これはリボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、万能塩基、または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができる。コンストラクトA-Fのアンチセンス鎖は、本発明のいずれかの標的核糖配列に相補的な配列を含む。

[0203]

図5A-Fは、本発明の化学的に修飾された特定のsINA配列の非限定的例を示す。A-Fは、図4A-Fに示される化学的修飾をHIV sINA配列に適用したものである。

[0204]

図6は、本発明の種々のsINAコンストラクトの非限定的例を示す。示される例(コンストラクト1, 2, および3)は典型的な19塩基対を有するが、本発明の異なる塩基には本明細書に記載される任意の塩基対が含まれる。括弧内の領域は、例えば約1, 2, 3, または4ヌクレオチドの長さ、好ましくは約2ヌクレオチドを含むヌクレオチドオーバーハングを表す。コンストラクト1および2は、RNAi活性用に独立して用いることができる。コンストラクト2は、ポリヌクレオチドまたは非ヌクレオチドリソナーを含むことができ、これは、任意に、生物分解性リソナーとして設計することができる。1つの態様においては、コンストラクト2に示されるルーブ構造は生物分解性リソナーを含むことができ、このことにより、インビボおよび/またはインビトロでコンストラクト1が形成される。別の例においては、同じ原理でコンストラクト2を生成するためにコンストラクト3を用いることができ、ここで、リソナーはインビボおよび/またはインビトロで活性なsINAコンストラクト2を生成するために用いられ、これは任意に別の生物分解性リソナーを用いてインビボおよび/またはインビトロで活性なsINAコンストラクト1を生成することができる。そのように、sINAコンストラクトの安定性および/または活性は、インビボまたはインビトロで、および/またはインビトロにおいて用いた

めのsINAコンストラクトの設計に基づいて調節することができる。

[0205]

図7A-Cは、sINAヘアピンコンストラクトを生成するための発現カセットを構築するために用いられるスキームの概略図である。

[0206]

図7A：5'-制限部位(R1)配列、次に予め決定されたHIV標的配列と同一の配列を有する領域(sINAのセンス領域)を含むようにDNAオリゴマーを合成する。ここで、センス領域は、例えば、約19, 20, 21, または22ヌクレオチド(N)の長さを有し、その後には例えば約3-約10ヌクレオチドを含む規定された配列(X)のルーブ配列を有する。

[0207]

図7B：次に、合成コンストラクトをDNAポリメラーゼにより伸長して、自己相補的配列を有するヘアピン構造を生成し、このことにより、HIV標的配列に対する特異性を有し、自己相補的センス領域およびアンチセンス領域を有するsINA転写産物が得られる。

[0208]

図7C：コンストラクトを加熱(例えば約95℃)して、配列を直鎖状とすることにより、第1の鎖の3'-制限配列に対するグライマーを用いて相補的な第2のDNA鎖を伸長することができる。次に、二本鎖DNAを細胞における発現用の適当なベクター中に挿入する。コンストラクトは、例えば、制限部位を設計することにより、および/またはPauli(2002, Nature Biotechnology, 29, 505-508)に記載されるようにポリリ末端領域を利用することにより、転写により3'末端ヌクレオチドオーバーハングが生ずるように設計することができる。

[0209]

図8A-Cは、発現カセットを複製して二本鎖sINAコンストラクトを生成するために用いられるスキームの概略図である。

[0210]

図8A：5'-制限(R1)部位配列、次に予め決定されたHIV標的配列と同一の配列を有する領域(sINAのセンス領域)を有するように、DNAオリゴマーを合成する。ここで、センス領域は、例えば、約19, 20, 21, または22ヌクレオチド(N)の長さを含み、その後には規定された配列(X)のルーブ配列に隣接する3'-制限部位(R2)を有する。

[0211]

図8B：次に、合成コンストラクトをDNAポリメラーゼで伸長させて、自己相補的配列を有するヘアピン構造を生成する。

[0212]

図8C：コンストラクトをR1およびR2に特異的な制限酵素で処理して二本鎖DNAを生成し、次にこれを細胞における発現用の適当なベクター中に挿入する。UGプロモーター領域がdsDNAの両側を挟むように転写カセットを設計し、このことによりsINAの別々のセンス鎖およびアンチセンス鎖が生ずる。ポリリ末端配列をコンストラクトに付加して、得られる転写産物中にオーバーハングを生成することができる。

[0213]

図9A-Eは、特定の標的核糖配列、例えばメッセンジャーRNA中のsINA媒介性RNAの標的部位を決定するために用いられる方法の概略図である。

[0214]

図9A：sINAコンストラクトのアンチセンス領域が標的核糖配列の全域で標的部位に対する相補性を有し、センス領域がsINAのアンチセンス領域に相補的な配列を含むよう、sINAオリゴヌクレオチドのプールを合成する。

[0215]

図9BおよびC：配列をプールし、ベクターの細胞中へのトランスフェクションにより

s i N A が発現するように (図 9 C), ベクター中に挿入する (図 9 B)。

[0216] 図 9 D: 標的核酸配列の調節に伴う表現型の変化に基づいて細胞を分類する。

[0217]

図 9 E: 分類された細胞から s i N A を単離し、シーケンスして、標的核酸配列中の有効な標的部位を同定する。

[0218]

図 10 は、例えば、本発明の s i N A 配列の 3' 末端を安定化させるために用いることができる、種々の安定化化学 (1-10) の非限定的例を示す: (1) [3'-3']-反転デオキシリボース; (2) デオキシリボスチオチド; (3) [5'-3']-3'-デオキシリボスチオチド; (4) [5'-3']-リボスチオチド; (5) [5'-3']-3'-0-メチルリボスチオチド; (6) 3'-グリセリル; (7) [3'-5']-3'-デオキシリボスチオチド; (8) [3'-3']-デオキシリボスチオチド; (9) [5'-2']-デオキシリボスチオチド; および (10) [5'-3']-デオキシリボスチオチド。図面に示されている修飾および非修飾の骨格化学に加えて、これらの化学を本明細書に記載されるような別の骨格修飾、例えば、式 I を有する骨格修飾と組み合わせることができる。さらに、示される末端修飾の 5' 側に示される 2'-デオキシスチオチドは、本明細書に記載される別の修飾または非修飾スチオチドまたは非スチオチド、例えば、式 I-VII またはそれらの任意の組み合わせを有する修飾であってもよい。

[0219]

図 11 は、ヌクレオースに耐性であるが RNAi 活性を媒介する能力を保持している本発明の化学的に修飾された s i N A コンストラクトを同定するために用いる戦略の非限定的例を示す。経験に基づき設計パラメータ (例えば、2'-修飾、塩基修飾、骨格修飾、末端キャップ修飾等の導入) に基づいて s i N A コンストラクトに化学修飾を導入する。修飾されたコンストラクトを適当な系 (例えば、示されるようにヌクレオース耐性についてはヒト血清、または PK/デリバリ-ペラムータについては動物モデル) で試験する。平行して、例えば、細胞培養系において、例えば、ルシフェラーゼ reporter を有するが RNAi 活性を保持しているリポート s i N A コンストラクトを同定し、これをさらに修飾し、再びアッセイする。この同じ方法を用いて、改良された薬物動態学的プロファイル、デリバリ-、および RNAi 活性を有する s i N A-コンジュゲート分子を同定することができる。

[0220]

発明の詳細な説明

本発明の核酸分子の作用のメカニズム

以下の議論は、現在知られている短干渉 RNA により媒介される RNA 干渉の提唱されるメカニズムを記載するが、限定を意味するものではなく、先行技術であると認めるものではない。本出願人は、本明細書において、化学的に修飾された短干渉核酸が s i R N A 分子と類似のまたは改良された RNAi 媒介能力を有し、インビトロで改良された安定性および活性を有すると予測されることを示す。したがって、この議論は、s i R N A のみに限定されることを意味するものではなく、s i N A 全体に適用することができ、"RNAi"を媒介する改良された能力"または"改良された RNAi 活性"とは、インビトロおよび/またはインビトロで測定された RNAi 活性を含むことを意味し、ここで、RNAi 活性は s i N A が RNAi を媒介する能力と本発明の s i N A の安定性との両方を反映する。本発明においては、これらの活性の積を、全 RNA s i N A または複数のリボヌクレオチドを含む s i N A と比較して、インビトロおよび/またはインビトロで増加させることができる。場合によっては、s i N A 分子の活性または安定性は低下するかもしれない (すなわち、10 分の 1 以下)、s i N A 分子の全体的活性はインビトロおよび/またはインビトロで増強される。

[0221]

RNA 干渉とは、動物において短干渉 RNA (s i R N A) により媒介される配列特異的転写後遺伝子サイレンシングのプロセスを表す (Fire et al., 1998, Nature, 391, 806)。植物における対応するプロセスは一般に転写後遺伝子サイレンシングまたは RNA サイレncing と称され、真核においてはクエリンクとも称される。転写後遺伝子サイレンシングのプロセスは、外来遺伝子の発現を防止するために用いられる進化的に保存された細胞防御メカニズムであると考えられており、異なる態および門が共通して有している (Fire et al., 1999, Trends Genetics, 15, 358)。そのような外来遺伝子発現からの防御は、ウイルス感染または宿主ゲノム中へのトランスポゾン要素のランダムインテグレーションから生ずる二本鎖 RNA (dsRNA) の生成に依存して、相同的一本鎖 RNA またはウイルスゲノム RNA を特異的に破壊する細胞応答により進化してきたのである。細胞における dsRNA の存在は、まだ完全には特性決定されていないメカニズムにより、RNAi 応答を引き起こす。このメカニズムは、蛋白質キナーゼ PKR および 2', 5'-オリゴデニレートシターゼの dsRNA 媒介性活性化の結果、リボヌクレオースによる mRNA の非特異的切断が生ずるインターフェロン応答とは異なるようである。

[0222]

細胞中に長い dsRNA が存在すると、ダイサーと称されるリボヌクレオース II 酵素の活性が刺激される。ダイサーは、dsRNA をプロセッシングして短干渉 RNA (s i R N A) として知られる短い断片の dsRNA とすることに関与している (Bershtein et al., 2001, Nature, 409, 363)。ダイサー活性から生ずる短干渉 RNA は、典型的には約 21-23 ヌクレオチドの長さであり、約 19 塩基対のデュエレーションを含む。ダイサーはまた、翻訳制御における関与が示されている保存された構造の前駆体 RNA から 21 および 22 ヌクレオチドの小さな一時的 RNA (s i R N A) を切り出すことに関与することが示唆されている (Huivagner et al., 2001, Science, 293, 834)。RNAi 応答はまた、一般に RNA 誘導性サイレンシング複合体 (RISC) と称される、s i R N A を含むエンゾヌクレオース複合体を特徴とし、これは s i R N A と相同な配列を有する一本鎖 RNA の切断を媒介する。標的 RNA の切断は、s i R N A デュエレーションのカイド配列に相補的な領域の中央部で生ずる (Elbashir et al., 2001, Genes Dev., 15, 188)。さらに、RNA 干渉には、小さい RNA (例えば、マイクロ RNA または miRNA) に媒介される遺伝子サイレンシングが関与する場合もある。これはおそらくは、クロマチン構造を制御する細胞性メカニズムによるものであり、このことにより標的遺伝子配列の転写が妨害される (例えば、Allshire, 2002, Science, 297, 1818-1819; Volpe et al., 2002, Science, 297, 1833-1837; Jennewein, 2002, Science, 297, 2215-2218; および Hall et al., 2002, Science, 297, 2232-2237 を参照)。このように、本発明の s i N A 分子は、RNA 転写産物との相互作用を介して、あるいは特定の遺伝子配列との相互作用により、遺伝子サイレンシングを媒介するために用いることができ、そのような相互作用により転写レベルまたは転写後レベルのいずれかで遺伝子サイレンシングが生ずる。

[0223]

RNAi は種々の系で研究されてきた。Fire (1998, Nature, 391, 806) は、C. Elegans において最初に RNAi を観察した。Wianny および Goetz (1999, Nature Cell Biol., 2, 70) は、マウス胚において dsRNA により媒介される RNAi を記載する。Hammond (2000, Nature, 404, 293) は、dsRNA でトランスフェクトしたショウジョウバエ細胞における RNAi を記載する。Elbashir (2001, Nature, 411, 494) は、培養哺乳動物細胞、例えばヒト胚性腎臓細胞および HeLa 細胞において、合成の 21 ヌクレオチド RNA のデュエレーションを導入することにより誘

導されるRNAiを記載する。ショウジョウバエ胚溶解物における最近の研究は、効率的なRNAi活性を媒介するために必須であるsiRNAの長さ、構造、化学組成、および配列についてのある種の要件を明らかにした。これらの研究は、21ヌクレオチドのsiRNAデュープレックスは2つの2ヌクレオチド3'末端ヌクレオチド-オーバーハングを含む場合に最も活性であることを示した。さらに、一方または両方のsiRNA鎖を2'-デオキシまたは2'-オメチルヌクレオチドで置換するとRNAi活性が破壊されるが、3'末端siRNAヌクレオチドをデオキシヌクレオチドで置換することは許容されることと示された。siRNAデュープレックスの中心におけるミスマッチ配列もまたRNAi活性を破壊することが示された。さらに、これらの研究はまた、標的RNAにおける切断部位の位置はsiRNAガイド配列の3'末端ではなく5'末端により規定されることを示した(Eibashir et al., 2001, EMBO J., 20, 6877)。他の研究は、siRNAデュープレックスの標的相補鎖の5'-リン酸がsiRNA活性に必要であり、siRNAの5'-リン酸成分を維持するためにATPが用いられることを示したが(Nykanen et al., 2001, Cell, 107, 309)。5'-リン酸を欠失したsiRNAは外的に増入したときに活性であり、このことは、インビボでsiRNAコンストラクトの5'-リン酸化が生じているかもしれないことを示唆する。

【0224】

核糖分子の合成

100ヌクレオチドを超える長さの核糖の合成は、自動化方法を用いては困難であり、そのような分子の治験コストは非常に高くなる。本発明においては、好ましくは、小さい核糖モチーフ(“小さい”)とは、100ヌクレオチド以下の長さ、好ましくは80ヌクレオチド以下の長さ、最も好ましくは50ヌクレオチド以下の長さの核糖モチーフ、例えば、別々のsiRNAオリゴヌクレオチド配列またはタンデムで合成されたsiRNA配列を表す)が外的デリバリーに用いられる。これらの分子は構造が簡単であるため、核糖が蛋白質および/またはRNA構造の標的領域に進入する能力が高い。本発明の例示的分子は化学的に合成するが、他の分子も同様に合成することができる。

【0225】

オリゴヌクレオチド(例えば、ある種の修飾オリゴヌクレオチドまたはリボヌクレオチドを欠失しているオリゴヌクレオチドの一部)は、例えば、Caruthers et al., 1992, Methods in Enzymology 211, 3-19, Thompson et al., 国際公開99/54459, Wincott et al., 1995, Nucleic Acids Res. 23, 2677-2684, Wincott et al., 1997, Methods Mol. Biol., 74, 59, Brennan et al., 1998, Biotechnol Bioeng., 61, 33-45, およびBrennan, 米国特許6,001,311に記載されるような、当該技術分野において知られるプロトコルを用いて合成する(これらの文献はすべて本明細書の一部としてここに引用する)。オリゴヌクレオチドの合成は、一般の核酸保護基およびカップリング基、例えば5'末端にジメトキシトリチル、および3'末端にホスホルミダイトを用いて行う。非限定的例においては、394 Applied Biosystems, Inc. 合成器で、0.2μmolスケールのプロトコルで、2'-オメチル化ヌクレオチドについては2.5分間のカップリング工程、および2'-デオキシヌクレオチドまたは2'-フルボキシ-2'-フルボキシヌクレオチドについては45秒間のカップリング工程で、小スケールの合成を行う。表Vは、合成サイクルで用いる試薬の量および接触時間の概要を示す。あるいは、0.2μmolスケールでの合成は、96ウェルプレート合成機、例えば、Photogene (Palo Alto, CA)により製造される装置で、サイクルに最少の改変を加えて行うことができる。2'-オメチル化ヌクレオチドの各カップリングサイクルにおいては、ボリマー結合5'-ヒドロキシシルに対して33倍過剰(60μLの0.11M=6.6μmol)の2'-オメチル化ヌクレオチドおよび105倍過剰の5'-エチルトリチル(60μLの0.25M=15

μmol)を用いることができる。デオキシ残基の各カップリングサイクルにおいては、ボリマー結合5'-ヒドロキシシルに対して22倍過剰(40μLの0.11M=4.4μmol)のデオキシホスホルミダイトおよび70倍過剰のS-エチルトリチル(40μLの0.25M=10μmol)を用いることができる。394 Applied Biosystems, Inc. 合成機における平均カップリング吸収率は、トリチル画分の比色定数により決定し、典型的には97.5-99%である。394 Applied Biosystems, Inc. 合成器で用いる他のオリゴヌクレオチド合成試薬は以下のとおりである：脱トリチル化溶液は塩化メチレン中3%TCA(AB1)であり；キヤピングは、THF中16%N-メチルイミダゾール(AB1)およびTHF中10%無水酢酸/10%2,6-ルチジン(AB1)中で行い；酸洗液は、THF中16.9%1,49mMピリジン, 9%水(PERSEPTIVE (登録商標))である。Burdick & Jackson 合成等級アセトニトリルは試薬瓶から直接用いる。S-エチルトリチル溶液(アセトニトリル中0.25M)は、American International Chemical, Inc. から入手した固体から作成する。あるいは、ホスホルミダイト結合の導入のためには、ボリマー結合試薬(3H-1,2-ペンタジチオール-3-オン1,1-ジオキシド, アセトニトリル中0.05M)を用いる。

【0226】

DNA系オリゴヌクレオチドの脱保護は以下のように行う：ボリマー結合トリチルオリゴ(1mL)の溶液中で65℃で10分間懸濁する。20℃に冷却した後、上清をボリマー支持体から取り出す。支持体を1.0mLのEtOH:MeCN:H₂O/3:1:1で3回洗浄し、ボルベックスし、次に上清を最初の上清に加える。オリゴリボヌクレオチドを含む合わせた上清を乾燥して、白色粉末を得る。

【0227】

本発明のある種のsiNA分子を含むRNAiについて用いられる合成方法は、Usmanら(1987 J. Am. Chem. Soc., 109, 7845), Scaringeら(1990 Nucleic Acids Res., 18, 5433)およびWincottら(1995 Nucleic Acids Res. 23, 2677-2684), Wincottら(1997, Methods Mol. Biol., 74, 59)に記載の方法にいたがい、慣用の核酸保護基およびカップリング基、例えば、5'末端にジメトキシトリチル、および3'末端にホスホルミダイトを用いて行う。非限定的例においては、小スケールの合成は、394 Applied Biosystems, Inc. 合成器で、改変した0.2μmolスケールのプロトコルを用いて、アルキルシリル保護ヌクレオチドについては7.5分間のカップリング工程を、2'-オメチル化ヌクレオチドについては2.5分間のカップリング工程を行う。表Vは、合成サイクルで用いられる試薬の量および接触時間の概要を示す。あるいは、0.2μmolスケールでの合成は、96ウェルプレート合成機、例えば、Photogene (Palo Alto, CA)により製造される装置で、サイクルに最少の改変を加えて行うことができる。2'-オメチル化ヌクレオチドの各カップリングサイクルにおいては、ボリマー結合5'-ヒドロキシシルに対して33倍過剰(60μLの0.11M=6.6μmol)の2'-オメチル化ヌクレオチドおよび75倍過剰のS-エチルトリチル(60μLの0.25M=15μmol)を用いることができる。リボ残基の各カップリングサイクルにおいては、ボリマー結合5'-ヒドロキシシルに対して66倍過剰(120μLの0.11M=13.2μmol)のアルキルシリル(リボ)保護ホスホルミダイトおよび150倍過剰のS-エチルトリチル(120μLの0.25M=30μmol)を用いることができる。394 Applied Biosystems, Inc. 合成機における平均カップリング吸収率は、トリチル画分の比色定数により決定し、典型的には97.5-99%である。394 Applied Biosystems, Inc. 合成器で用いる他のオリゴヌクレオチド合成試薬は以下のとおりである：脱トリチル化溶液は塩化メチレ

ン中3% TCA (ABI) であり; キヤピドンジは, THF 中16% N-メチルイミダゾール (ABI) および THF 中10% 無水酢酸/10% 2, 6-ルチジン (ABI) 中で行い; 酸化溶液は, THF 中16, 9 mM Li_2 , 49 mM ピリジン, 9% 水 (PERS EPTIVE (登録商標)) である。Burdick & Jackson 合成等級アセトニトリルは試薬瓶から直接用いる。S-エチルチトリアル溶液 (アセトニトリル中0.25 M) は, American International Chemical, Inc. から入手した固体から作成する。あるいは, ホスホロチオエーリ結合の導入のためには, ポリケージ試薬 (3H-1, 2-ベンゾジチオール-3-オン1, 1-ジオキシド, アセトニトリル中0.05 M) を用いる。

[0228] RNA の脱保護は, 2ポットプロトコルまたは1ポットプロトコルのいずれかを用いて行う。2ポットプロトコルについては, ポリマー結合トリチルオソリゴリボヌクレオチドを4 mL のガラスねじ蓋バイアルに移し, 40% 水性メチルアミン (1 mL) の溶液中で65℃で10分間懸濁する。-20℃で冷却した後, 上清をポリマー支持体から取り出す。支持体を1.0 mL の EtOH:MeCN:H₂O/3:1:1 で3回洗浄し, ボールテックスし, 次に上清を最初の上清に加える。オリゴリボヌクレオチドを含む合わせた上清を乾燥して, 白色粉末を得る。塩基脱保護オリゴリボヌクレオチドを無水TEA/HF/NMP 溶液 (1.5 mL N-メチルピロリジン, 750 μ L TEA および1.0 mL TEA \cdot 3HF の溶液300 μ L, HF 濃度1.4 M) に再懸濁し, 65℃に加熱する。1.5時間後, オリゴマーを1.5 M NH₄HCO₃ で反応を停止させる。

[0229] あるいは, 1ポットプロトコルのためには, ポリマー結合トリチルオソリゴリボヌクレオチドを4 mL のガラスねじ蓋バイアルに移し, 33% エタノール性メチルアミン/DMSO:1/1 (0.8 mL) の溶液中で, 65℃で15分間懸濁する。バイアルを室温にする。TEA \cdot 3HF (0.1 mL) を加え, バイアルを65℃で15分間加熱する。試料を-20℃で冷却し, 次に1.5 M NH₄HCO₃ で反応を停止させる。

[0230] トリチルオソリゴマーの精製のためには, 停止したNH₄HCO₃ 溶液を, アセトニトリル, 続いて50 mM TEA で予備洗浄したC-18 含有カトリッジに負荷する。負荷したカトリッジを水で洗浄した後, RNA を0.5% TFA で13分間脱トリチル化する。次にカトリッジを水で再び洗浄し, 1M NaCl で塩交換し, 再び水で洗浄する。次に, 30% アセトニトリルでオリゴヌクレオチドを溶出する。

[0231] 平均段階カッピング収率は, 典型的には>98% である (Wincott et al., 1995 Nucleic Acids Res. 23, 2677-2684)。当業者は, 合成のスケールは, 上述の例より大きくまたは小さく, 例えば, 限定されないが, 96ウェルのマイクロプレートに適合させることができると認識するであろう。

[0232] あるいは, 本発明の核酸分子は, 別々に合成して, 合成後に例えばライゲーションにより (Moore et al., 1992, Science 256, 9923; Draper et al., 国際公開WO93/23569; Shabarova et al., 1991, Nucleic Acids Research 19, 4247; Bellion et al., 1997, Nucleosides & Nucleotides 16, 951; Bellion et al., 1997, Nucleosides & Nucleotides, Bellion et al., 1997, Bioconjugate Chem. 8, 204), または合成および/または脱保護の後にハイブリダイゼーションにより, 一緒につなげてよい。

[0233] 本発明の siNA 分子はまた, 本明細書の実施例1に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では, 両方の siNA 鎖を, 切断可能なリソナー

により分離された単一の連続するオリゴヌクレオチドフラグメントまたは鎖として合成し, 次にこれを切断して別々の siNA フラグメントまたは鎖を生成し, これはハイブリダイズして siNA デュエーリングの精製を可能とする。リソナーはポリヌクレオチドリソナーであったり非ヌクレオチドリソナーであったりもよい。本明細書に記載される siNA のタンデム合成は, ヴァルチウエル/ヴァルチアレット合成フラットフォーム, 例えば96ウェルまたは同様のより大きなヴァルチウエルフラットフォームのいずれにも容易に適合させることができる。本明細書に記載される siNA のタンデム合成はまた, バッチリアクター, 合成カラムなどを用いる大規模合成フラットフォームにも容易に適合させることができる。

[0234] siNA 分子はまた, 一方のフラグメントがRNA分子のセンス領域を含み, 第2のフラグメントがアンチセンス領域を含む2つの別々の核酸鎖またはフラグメントから組み立ててもよい。

[0235] 本発明の核酸分子は, 広範囲に修飾して, スケレアーゼ耐性基, 例えば, 2'-アミノ, 2'-C-アリル, 2'-フルオロ, 2'-O-メチル, 2'-Hによる修飾により安定性を高めることができる (概説として, Usman and Cedergren, 1992, TIBS 17, 34; Usman et al., 1994, Nucleic Acids Symp. Ser. 31, 163を参照)。siNAコンストラクトは, 一般的方法を用いてゲル電気泳動により精製するか, または高速液体クロマトグラフィー (HPLC; Wincott et al., (上掲) を参照, その全体を本明細書の一部としてここに引用する) により精製し, 水に再懸濁する。

[0236] 本発明の別の観点においては, 本発明の siNA 分子は, DNA またはRNA ベクター中に挿入された転写ユニットから発現される。組換えベクターは, DNA フラスミドまたはウイルスベクターでありうる。siNA を発現するウイルスベクターは, 限定されないが, アデノ随伴ウイルス, レトロウイルス, アデノウイルスまたはアルファウイルスに基づいて構築することができる。siNA 分子を発現しうる組換えベクターを本明細書に記載されるようにデリバリーし, 標的細胞中に残留させることができる。あるいは, siNA 分子の過剰的発現を与えるウイルスベクターを用いてもよい。

[0237] 本発明の核酸分子の活性の最適化

修飾 (塩基, 糖および/またはリン酸) を有する化学的に合成した核酸分子は, 血清リボヌクレアーゼによる分解を防止することができる。このことによりその抗力を高めることができる (例えば, Rckstein et al., 国際公開WO92/07065; Perrault et al., 1990 Nature 344, 565; Plek et al., 1991 Science 253, 314; Usman and Cedergren, 1992 Trends in Biochem. Sci. 17, 334; Usman et al., 国際公開WO93/15187; Rossi et al., 国際公開WO91/03162; Sproat, 米国特許5, 334, 711; Gold et al., US6, 300, 074 および Burgin et al., (上掲) を参照 (これらはすべて本明細書の一部としてここに引用する)。上述の参考文献はすべて, 本明細書に記載される核酸分子の塩基, リン酸および/または糖成分になしうる種々の化学修飾を記載する。細胞中におけるその抗力を増強するよう修飾し, およびオリゴヌクレオチドの合成時間を短縮し化学物質の必要性を減少するために核酸分子から塩基を除去することが望ましい。

[0238] 当該技術分野には, そのヌクレアーゼ安定性および効力を有意に増強することができる核酸分子中に導入することができる糖, 塩基およびリン酸修飾を記述するいくつもの例がある。例えば, オリゴヌクレオチドは, スケレアーゼ耐性基, 例えば, 2'-アミノ,

2'-C-アリル, 2'-フルオロ, 2'-O-メチル, 2'-O-アリル, 2'-H等のヌクレオチド塩基修飾で修飾することにより, 安定性を高め, および/または生物学的活性を増強するために修飾される(総説については, Usman and Cedergren, 1992, TIBS 17, 34; Usman et al., 1994, Nucleic Acids Symp. Ser. 31, 163; Burgin et al., 1996, Biochemistry 35, 14090を参照)。核酸分子の精修は, 当該技術分野において広く記載されている(Eckstein et al., 国際公開WO92/07065; Perrault et al., Nature 1990, 344, 565-568; Pieken et al., Science 1991, 253, 314-317; Usman and Cedergren, Trends in Biochem. Sci. 1992, 17, 334-339; Usman et al., 国際公開WO93/15187; Sproal, 米国特許5,334,711, Beigelman et al., 1995, J. Biol. Chem. 270, 25702; Beigelman et al., 国際公開WO97/26270; Beigelman et al., 米国特許5,716,824; Usman et al., 米国特許5,627,053; Woolf et al., 国際公開WO98/13526; Thompson et al., 米国特許出願60/082,404(1998年4月20日出願); Karpelsky et al., 1998, Tetrahedron Lett., 39, 1131; Earnshaw and Gait, 1998, Biochemistry (Nucleic Acid Sciences), 48, 39-55; Verma and Eckstein, 1998, Annu. Rev. Biochem. 67, 99-134; およびBurkina et al., 1997, Biochem. Med. Chem., 5, 1999-2010を参照, これらの参考文献はすべて, その全体を本明細書の一部としてここに引用する)。これらの刊行物は, 触媒活性を変化することなく, 糖, 塩基および/またはリン酸修飾等を核酸分子中に組み込む位置を決定する一般的な方法および戦略を記載しており, 本明細書の一部としてここに引用する。このような示の観点から, siNAが細胞においてRNAiを促進する能力が有意に阻害されない限り, 本明細書に記載されるように, 同様の修飾を用いて本発明のsiNA核酸分子を修飾することができ。

[0239]

ホスホロチオエート, ホスホロジチオエート, および/または5'-メチルホスホネート結合によるオリゴヌクレオチドのヌクレオチド間結合の化学修飾は安定性を改良するが, 過剰な修飾はある種の毒性または活性の低下を引き起こしうる。したがって, 核酸分子を設計する場合, これらのヌクレオチド間結合の量は最小にすべきである。これらの結合の濃度を減少させると, 毒性が低下し, これらの分子の効力が増加し特異性が高くなるはずである。

[0240]

活性を維持または増強する化学的修飾を有する短干渉核酸(sRNA)分子が提供される。そのような核酸はまた, 一般に非修飾核酸よりヌクレオチドに対する親性が高い。したがって, イントロおよび/またはイントロで活性は顕著に低下しないはずである。調節が目的である場合には, 外的にデリバリーされる治療核酸分子は, 最適には, 望ましくない蛋白質のレベルが低下するのに充分長い時間隔のRNAの細胞が調節されるまで細胞内で安定であるべきである。この時間は, 疾病の状態により数時間から数日まで様々である。RNAおよびDNAの化学合成における進歩(Wincott et al., 1995, Nucleic Acids Res. 23, 2677; Caruthers et al., 1992, Methods in Enzymology 211, 3-19 (本明細書の一部としてここに引用する))により, 上述のようにヌクレオチド修飾を導入してそのヌクレオチド安定性を高めることにより, 核酸分子を改変する可能性が拡大した。

[0241]

1つの態様においては, 本発明の核酸分子は, 1またはそれ以上(例えば, 約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上)のGクランツヌクレオチドを含む。Gクランツヌクレオチドは, 修飾シトシン類似体であり, ここで, 修飾は, デーゼルヌスとの相補的グアニンのワットソン-クリックおよびフーグスチーン面の両方の水素結合の能力を与える。例えば, Lin and Matteucci, 1998, J. Am. Chem. Soc., 120, 8531-8532を参照。オリゴヌクレオチド中の単一のGクランツ類似体置換により, 相補的オリゴヌクレオチドにハイブリダイスしたときからせん熱安定性およびミスマッチ識別性を実質的に増強することができ。そのようなヌクレオチドを本発明の核酸分子中に取り込ませることにより, 核糖鎖の相補的配列または、本発明の核酸分子は1またはそれ以上(例えば, 約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上)のLNA"ロック"核酸"ヌクレオチド, 例えば, 2', 4'-Cメチルペンビシクロヌクレオチドを含む(例えば, Wengel et al., 国際公開WO00/66604およびWO99/14226を参照)。

[0242]

別の態様においては, 本発明のsiNA分子のコンジュゲートおよび/または複合体を特徴とする。そのようなコンジュゲートおよび/または複合体は, 生物学的システム, 例えば細胞へのsiNA分子のデリバリーを容易にするために用いることができる。本発明により提供されるコンジュゲートおよび複合体は, 治療用化合物を細胞膜を超えて輸送し, 薬物動態学を変更し, および/または本発明の核酸分子の局在化を調節することにより, 治療的活性を付与することができ。本発明は, 分子, 例えば, 限定されないが, 小分子, 脂質, リン脂質, ヌクレオチド, 核酸, 抗体, トキシン, 負に荷電したポリマーおよび他のポリマー, 例えば, 蛋白質, ペプチド, ホルモン, 炭水化物, ポリエチレングリコール, またはポリアミンを, 細胞膜を横切ってデリバリーするための, 新規コンジュゲートおよび複合体の設計および合成を含む。一般に, 記載されるコンジュゲートは, 個々にまたは多成分系の一部として, 分解性リソカー付きでまたはなしで用いるよう設計される。これらの化合物は, 血管の存在下または非存在下で, 本発明の核酸分子を異なる組織に由来する多数の細胞タイプにデリバリーおよび/または局在化することを変更すると予測される(Suilienger and Czech, 米国特許5,854,038を参照)。本明細書に記載される分子のコンジュゲートは, 生物分解性のリソカー, 例えば生物分解性核酸リソカー分子を介して, 生物学的に活性な分子に結合させることができる。

[0243]

本明細書において用いる場合, "生物分解性リソカー"との用語は, 1つの分子を別の分子に, 例えば, 生物学的に活性な分子を本発明のsiNA分子に, または本発明のsiNA分子のセンズ鎖とアンチセンス鎖とを接続するための生物分解性リソカーとして設計される核酸または非核酸リソカー分子を表す。生物分解性リソカーは, 特定の目的, 例えば特定の組織または細胞タイプへのデリバリーのためにその安定性を調節することができるように設計する。核酸に基づく生物分解性リソカー分子の安定性は, リボヌクレオチド, デオキシリボヌクレオチド, および化学的に修飾されたヌクレオチド, 例えば, 2'-O-メチル, 2'-フルオロ, 2'-アミノ, 2'-O-アミノ, 2'-C-アリル, 2'-O-アリル, および他の2'-修飾または塩基修飾ヌクレオチドの種々の組み合わせを用いることにより調節することができ。生物分解性核酸リソカー分子は, タイマー, リザー, テトラマー, またはより長い核酸分子, 例えば, 約2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, または20ヌクレオチドの長さのオリゴヌクレオチドであることができ, またはリン酸に基づく結合, 例えば, ホスホルアミドまたはホスホエステル結合を有する単一のヌクレオチドを含むことができる。生物分解性核酸リソカー分子はまた, 核酸骨格, 核酸鎖, または核酸塩基修飾を含むことができる。

[0244]

である。アルキニル基は、置換されていてもされなくてもよい。置換されている場合、置換基は、好ましくは、ヒドロキシル、シアノ、アルコキシ、 $=O$ 、 $=S$ 、 NO_2 または $N(CH_3)_2$ 、アミノまたはSHである。

[0255]

そのようなアルキル基はまた、アリール、アルキルアリール、炭素環式アリール、複素アリール、アミドおよびエステル基を含むことができる。"アリール"基とは、共役したπ電子系を有する少なくとも1つの環を有する芳香族基を表し、炭素環式アリール、複素環式アリールおよびニトリール基が含まれる。これらはすべて任意に置換されている。アリール基の好ましい置換基は、ハロゲン、トリハロメチル、ヒドロキシル、SH、OH、シアノ、アルコキシ、アルキル、アルケニル、アルキニル、およびアミノ基である。"アルキルアリール"基は、アリール基(上述)に共有結合したアルキル基(上述)を表す。炭素環式アリール基は、芳香族環の環原子がすべて炭素原子である基である。炭素原子は任意に置換されている。複素環式アリール基は、芳香族環中の環原子として1-3個の複素原子を有し、環原子の残りが炭素原子である基である。適当な複素原子には、酸素、イオウ、および窒素が含まれ、例えば、フラニル、チエニル、ピリジル、ピロリル、N-低級アルキルピロリル、ピリミジル、ピラジニル、イミダゾリル等が挙げられる。これらはすべて任意に置換されている。"アミド"とは、 $-C(O)-NH-R$ (式中、Rはアルキル、アリール、アルキルアリールまたは水素のいずれかである)を表す。"エステル"とは、 $-C(O)-OR'$ (式中、Rはアルキル、アリール、アルキルアリールまたは水素のいずれかである)を表す。

[0256]

本明細書において用いる場合、"ヌクレオチド"は、当該技術分野においては、天然塩基(糖準的)、および当該技術分野においてよく知られる修飾塩基を含むと認識されている。そのような塩基は、一般にヌクレオチド構成成分の1'位に位置する。ヌクレオチドは一般に、塩基、糖およびリン酸基を含む。糖、リン酸および/または塩基成分において修飾されているとされなくてもよい(互換的に、ヌクレオチド類似体、修飾ヌクレオチド、非天然ヌクレオチド、非標準的ヌクレオチド等とも称される。例えば、Usman and McSwigen (上掲); Eckstein et al., 国際公開WO92/07065; Usman et al., 国際公開WO93/15187; Uhlman and Peyman (上掲) (すべて本明細書の一部としてここに引用する)を参照)。当該技術分野において知られる修飾核酸塩基のいくつもの例があり、Limbach et al., 1994, *Nucleic Acids Res.* 22, 2183にまとめられている。核酸中に導入することができる塩基修飾のいくつもの非限定的例としては、例えば、イノシン、グリン、ピリジン-4-オン、ピリジン-2-オン、フェニル、シュートラシル、2,4,6-トリメトキシベンゼン、3-メチルウラシル、ジヒドロウリジン、チラシル、アミノフェニル、5-アルキルシチジン(例えば5-メチルシチジン)、5-アルキルウリジン(例えばリボチミジン)、5-ハロウリジン(例えば5-ブロモウリジン)または6-アザピリミジンまたは6-アルキルピリミジン(例えば6-メチルウリジン)、アロピンおよびその他のものが挙げられる(Burgin et al., 1996, *Biochemistry*, 35, 14090; Uhlman and Peyman, 上掲)。この観点において、"修飾塩基"とは、1'位におけるアデニン、グアニン、シトシンおよびウラシル以外のヌクレオチド塩基またはそれらの同物物を意味する。

[0257]

1つの態様においては、本発明はリン酸骨格修飾を有する修飾されたs i N A分子を特徴とし、これは1またはそれ以上のホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、モルホリノ、アミド、カルバメート、カルボキシメチル、アセトアミド、ボリアミド、ヌルホネート、ヌルホキシメート、ヌルホアセタール、チオホルムアセタール、および/またはアルキルシチル置換を含む。オリゴヌクレオチド骨格修飾の概観については、Hunziker and Le

umann, 1995, *Nucleic Acid Analogues: Synthesis and Properties, Modern Synthetic Methods*, VCH, 331-417, およびMessmaeker et al., 1994, *Novel Backbone Replacements for Oligonucleotides, Carbohydrate Modifications in Antisense Research*, ACS, 24-39を参照されたい。

[0258]

"塩基"とは、1'位において塩基を欠失しているか、または塩基の代わりに他の化学基を有する糖成分を意味する(例えば、Adamic et al., 米国特許5,998,203を参照)。

[0259]

"非修飾ヌクレオチド"とは、β-D-リボースの1'炭素に結合した塩基、アデニン、シトシン、グアニン、チミンまたはウラシルのいずれかの塩基を意味する。

[0260]

"修飾ヌクレオチド"とは、非修飾ヌクレオチドの塩基、糖および/またはリン酸の化学構造中に修飾を含む任意のヌクレオチド塩基を意味する。修飾ヌクレオチドの非限定的例は式I-VIIに示されるか、および/または本明細書に記載される他の修飾である。

[0261]

本発明において記載される2'-修飾ヌクレオチドに関して、"アミノ"とは、2'-NH₂または2'-O-NH₂を意味し、これは修飾されているとされなくてもよい。そのような修飾塩基は、例えば、Eckstein et al., 米国特許5,672,695およびMatulic-Adamic et al., 米国特許6,248,878(いずれもその全体を本明細書の一部としてここに引用する)に記載されている。

[0262]

核酸s i N A構造に対する種々の修飾を作成して、これらの分子の有用性を高めることができる。例えば、このような修飾は、製品寿命、インビトロの半減期、安定性、およびそのようなオリゴヌクレオチドを標的部位に導入する容易さを高め、例えば、細胞膜の透過性を高め、標的とする細胞を認識し結合する能力を付与するであろう。

[0263]

核酸分子の投与

本発明のs i R N A分子は、単独で、または他の療法と組み合わせて、例えば、HIV感染に関連する病状またはAIDSの治療に用いるために適合させることができる。例えば、s i N A分子は、被験者に投与するためのリボソーム等のデリバリーベヒクル、担体および希釈剤、およびそれらの塩を含むことができ、および/または薬学的に許容しうる処方中に存在することができる。核酸分子のデリバリーの方法は、Akhtar et al., 1992, *Trends Cell Bio.*, 2, 139; Delivery Strategies for Antisense, *Oligonucleotide Therapeutics*, ed. Akhtar, 1995; Maurer et al., 1999, *Mol. Membr. Biol.*, 16, 129-140; Hoff and Huang, 1999, *Handb. Exp. Pharmacol.*, 137, 165-192; およびLee et al., 2000, *ACSSymp.*, 5, 752, 184-192(いずれも本明細書の一部としてここに引用する)に記載されている。Beigelman et al., 米国特許6,395,713およびSullivan et al., PCT WO94/025955は、さらに、核酸分子をデリバリーするための一般的な方法を記載する。これらのプロトコルを用いて、事実上いかなる核酸分子もデリバリーすることができる。核酸分子は当業者に知られる種々の方法によって細胞に投与することができる。限定されないが、リボソームへの封入、イオントポレシス、または他のベヒクル、例えば、ヒドロゲル、シクロデキストリン(例えば、Gonzalez et al., 1999, *Bioconjugate Chem.*, 10, 1068-1074を参照)、生分解性ナノカプセル、および生体接着性

小球体への組み込み、または蛋白質性ベクター (O'Hare and Normand, 国際公開WO00/53722) によるものが含まれる。あるいは、核膜/ペリクルの組み合わせを、直接注入により、または注入ポンプを用いることにより局所的にデリバリーする。本発明の核膜分子の直接注入は、標準的な針とシリンジの方法論を用いて、または例えば Conry et al., 1999, *Cliva. Cancer Res.*, 5, 2330-2337 および Barry et al., 国際公開WO99/31262 に記載される無針手法により、皮下、筋肉内、または皮膚内に行うことができる。本発明の分子は医薬品として用いることができる。医薬品は、核膜における疾病状態を予防し、発症を調節しまたは治療する (症状がある程度、好ましくは症状をすべて軽減する)。

10

【0264】 本発明は、本発明の1またはそれ以上の核膜を、許容しうる担体、例えば安定剤、緩衝液等を含む医薬組成物の特徴とする。本発明のポリヌクレオチドは、安定剤、緩衝液等を用いてまたは用いずに医薬組成物を形成することにより、任意の標準的な手段により、投与 (例えば、RNA, DNA または蛋白質) し、被験者に導入することができる。リポソームデリバリーメカニズムを利用することが望ましい場合には、リポソームを形成する標準的なプロトコルにしたがうことができる。本発明の組成物はまた、経口投与用には錠剤、カプセルまたはエリキシールとして；直腸投与用には錠剤として；滅菌溶液として；注入投与の用には懸濁液として、および当該技術分野において知られる他の組成物として、処方し使用することができる。

20

【0265】

本発明はまた、記載される化合物の薬学的に許容しうる処方を含む。これらの処方には、上述の化合物の塩、例えば、酸付加塩 (例えば、塩酸、シュウ酸、酢酸およびペンソルホソ酸の塩) が含まれる。

【0266】

医薬組成物または処方は、細胞または被験者 (例えばヒト) への投与 (例えば全身投与) に適当な形態の組成物または処方を表す。適当な形態は、部分的には、使用する投与経路 (例えば経口、経皮、または注射) に依存する。そのような形態は、組成物または処方された細胞 (すなわち、真に荷電した核膜がデリバリーされる) が望まれる細胞) に到達することを妨害してはならない。例えば、血流中に注入される医薬組成物は可溶性でなければならない。他の因子は当該技術分野において知られており、例えば、毒性、および組成物または処方がその効果を発現することを妨害する形態等を考慮することが含まれる。

30

【0267】

“全身投与”とは、インジボまでの全身吸収、または血流中における薬剤の蓄積の後に全身に分配されることを意味する。全身的吸収をもたらす投与経路には、限定されないが、静脈内、皮下、腹腔内、吸入、経口、肺内および筋肉内に含まれる。これらの投与経路のそれぞれは、本発明の siRNA 分子をアッセイ可能な疾患組織に曝露する。薬剤が循環中に入る速度は、分子量またはサイエズの関数であることが示されている。本発明の化合物を含むリポソームまたは他の薬剤担体を使用することにより、薬剤を、例えば、あるタイプのア組織 (例えば網状内皮系 (RES) の組織) に局在化させることが可能である。薬剤と細胞 (例えば白血球およびマクロファージ) の表面との会合を容易にすることができ、リポソーム処方もまた有用である。この方法は、マクロファージおよび白血球による異常な細胞 (例えば過剰の HIV を産生する細胞) の免疫認識の特異性を利用することにより、薬剤の標的細胞への輸送を増強するのである。

40

【0268】

“薬学的に許容しうる処方”とは、本発明の核膜分子をその所望の活性に最も適した物理学的位置に有効に分布させることができる組成物または処方を意味する。本発明の核膜分子とともに処方するのに適した薬剤の非限定的例には以下のものが含まれる：CNS 中への薬剤の侵入を促進することができる P-糖蛋白質阻害剤 (Pluronic P-85 等

50

(Joliet-Riant and Tillement, 1999, *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 13, 16-26)；大脳内移植後の徐放輸送用の生分解性ポリマー、例えばポリ (DL-ラクチド-ε-グリコリド) 微小球 (Emrich, Df et al., 1999, *Cell Transplant.*, 8, 47-58) (Aikermes, Inc. Cambridge, MA)；および薬剤を脳血管関門を越えて輸送することができ、神経の取り込みメカニズムを変化しうる、例えばポリアクリレートから作成される充填されたナノ粒子 (Plog Neuropharmaceutical Biol Psychiatry, 23, 941-949, 1999)。本発明の核膜分子のデリバリー戦略の他の非限定的例には、Boad et al., 1998, *J. Pharm. Sci.*, 87, 1308-1315; Tyler et al., 1999, *FEBS Lett.*, 421, 280-284; Pardridge et al., 1995, *PNAS USA*, 92, 5592-5596; Boado, 1995, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 15, 73-107; Aldrian-Herrada et al., 1998, *Nucleic Acids Res.*, 26, 4910-4916; および Tyler et al., 1999, *PNAS USA*, 96, 7053-7058 に記載される物質が含まれる。

10

【0269】

本発明はまた、ポリ (エチレングリコール) 脂質 (PEG-修飾、または長期間循環リポソームまたはスチルスリポソーム) を含む表面修飾リポソームを含む組成物の使用を特徴とする。これらの処方は、標的組織における薬剤の蓄積を増加させる方法を提供する。この種類の薬剤担体は、単核食細胞システム (MPS または RES) によるオプソニン作用および排除に抵抗性であり、したがって、封入された薬剤の血流循環時間を長くし、組織への曝露を増強する (Lasic et al., *Chem. Rev.*, 1995, 95, 2601-2627; Ishiwata et al., *Chem. Pharm. Bull.*, 1995, 43, 1005-1011)。そのようなリポソームは、おそらくは脈管新生標的組織における流出および捕獲のため、腫瘍中に選択的に蓄積することが示されている (Lasic et al., *Science*, 1995, 267, 1275-1276; Oku et al., 1995, *Biochim. Biophys. Acta*, 1238, 86-90)。長期間循環リポソームは、特に、MPS の組織で蓄積することが知られている慣用のカチオン性リポソームと比べて、DNA および RNA の薬物動態学および薬力学を増強する (Liu et al., *J. Biol. Chem.*, 1995, 42, 24864-24870; Choi et al., 国際公開WO96/10390; Ansell et al., 国際公開WO96/10390; Holland et al., 国際公開WO96/10392)。長期間循環リポソームはまた、代謝的に攻撃的な MPS 組織、例えば肝臓および脾臓における蓄積を回避するその能力に基づいて、カチオン性リポソームと比較して薬剤をマクレーゼ分解からより強く保護するのである。

30

【0270】

本発明はまた、薬学的に有効な所望の化合物を薬学的に許容しうる担体または希釈剤中に含む、保存または投与用に調製される組成物を含む。治療用途に用いるための許容しうる担体または希釈剤は、医薬の技術分野においてよく知られており、例えば Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit., 1985) (本明細書の一部としてここに引用する) に記載されている。例えば、保存剤、安定剤、染料、および風味剤を用いることができる。これらには、安息香酸ナトリウム、ソルビン酸、および P-ヒドロキシ安息香酸のエステルが含まれる。さらに、抗酸化剤および懸濁剤を用いてもよい。

40

【0271】

薬学的に有効な用量とは、疾患状態の予防、発症の阻害、または治療 (症状がある程度

50

緩和し、好ましくはすべての症状を緩和する)に必要な用量である。薬学的に有効な用量は、疾患の種類、用いる組成物、投与の経路、治療する哺乳動物の種類、考慮中の特定の哺乳動物の物理学的特性、同時に投与される薬剤、および医薬の分野の当業者が認識するであろう他の因子によって異なる。一般に、負に荷電したポリマーの効力に依存して、 $0.1\text{ mg/kg} - 100\text{ mg/kg}$ 体重/日の活性成分を投与する。

[0272]

本発明の核酸分子およびその処方は、慣用的な無毒性の薬学的に許容しうる担体、アジバシトおよびペヒクルを含む用量単位処方で、経口的に、局所的に、非経口的に、吸入またはアブレーションにより、または直腸に投与することができる。本明細書において用いる場合、非経口的との用語には、経皮、皮下、血管内(例えば、静脈内)、筋肉内、または腔腔内注射または注入の手法等が含まれる。さらに、本発明の核酸分子および薬学的に許容しうる担体を含む医薬処方が提供される。1またはそれ以上の本発明の核酸分子は、1またはそれ以上の無毒性の薬学的に許容しうる担体および/または希釈剤、および/またはアジバシト、および所望の場合には他の活性成分とともに存在することができる。本発明の核酸分子を含む医薬組成物は、経口使用に適した形、例えば、錠剤、トローチ剤、錠剤、水性または油性懸濁液、分散可能な粉体または顆粒、乳剤、微カプセルまたは軟カプセル、またはシロップまたはエリキシル剤の形であることができる。

[0273]

経口で使用する意図される組成物は、医薬組成物の製造について当該技術分野において知られる任意の方法にしたがって製造することができる。そのような組成物は、薬学的に洗練された口を含む製品を提供するために、1またはそれ以上のそのような甘味料、芳香剤、着色剤または保存剤を含んでもよい。錠剤は、錠剤の製造に適した無毒性の薬学的に許容しうる賦形剤との混合物として活性成分を含む。これらの賦形剤は、例えば、不活性希釈剤、例えば、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、ラクトース、リン酸カルシウムまたはリン酸ナトリウム、顆粒化剤および崩壊剤、例えば、コーンスターチ、またはアルギン酸、結合剤、例えば、デンプン、ゼラチンまたはアラビアゴム、および潤滑剤、例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸またはタルクでありうる。錠剤は被覆しなくともよく、既知の手法により被覆してもよい。場合によっては、既知の手法によりそのような被覆を調製して、胃腸管における崩壊および吸収を遅延させ、このことによりより長い期間の持続的な作用を与えることができる。例えば、遅延用材料、例えばグリセリルモノステアレートまたはグリセリルジステアレートを用いることができる。

[0274]

経口使用のための処方は、活性成分が不活性固体希釈剤、例えば、炭酸カルシウム、リン酸カルシウムまたはカオリンと混合されている硬ゼラチンカプセル、または活性成分が水または油状媒体、例えば、ピーナツツ油、液体パラフィンまたはオリーブ油と混合されている軟ゼラチンカプセルであってもよい。

[0275]

水性懸濁液は、水性懸濁液の製造に適した賦形剤との混合物中に活性物質を含む。そのような賦形剤は、懸濁剤、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロプロピルメチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリドン、トララガントガムおよびアラビアゴムである。分散剤または懸濁剤は、天然に生ずるホフマン酸、例えば、レシチン、またはアルキルキレンオキシドと脂肪酸との縮合生成物、例えば、ステアリン酸ポリオキシエチレン、またはエチレンオキシドと長鎖脂肪酸生成物、例えば、ステアリン酸生成物、例えば、ヘキサデカエチレンオキシドと脂肪酸生成物、例えば、ポリオキシエチレンポリオールから誘導された部分エステルとの縮合生成物、例えば、ポリオキシエチレンポリオールモノオレエート、またはエチレンオキシドと脂肪酸生成物、例えば、ポリオキシエチレンポリオールから誘導された部分エステルとの縮合生成物、例えば、ポリオキシエチレンポリビタシモノオレエートであったとしてもよい。水性懸濁液はまた、1またはそれ以上の保存剤、例えば、エチルアルコール、またはロープロピルアルコール、またはヒドロキシベンゾエート、1またはそれ以上の着色剤、1またはそれ以上の芳香剤、および1またはそれ以上の甘味料、例

えばシロ糖またはサッカリンを含んでもよい。

[0276]

油性懸濁液は、活性成分を植物油、例えば、アラキス油、オリーブ油、ゴア油またはココナツツ油、または無機油、例えば、液体パラフィン中に懸濁させることにより処方することができる。油性懸濁液は、増粘剤、例えば、密ロウ、既パラフィンまたはセラルアルコールを含むことができる。甘味料および芳香剤を加えて、口を含む錠剤製品を得ることができる。これらの組成物は、抗酸化剤、例えばアスコルビン酸を加えることにより保存することができる。

[0277]

水を加えることにより水性懸濁液を製造するのに適した分散可能な粉体および顆粒は、活性成分を、分散剤または懸濁剤、懸濁剤および1またはそれ以上の保存剤との混合物中で与える。適当な分散剤または懸濁剤または顆粒は、上で例示したとおりである。さらに別の賦形剤、例えば、甘味料、芳香剤および着色剤が存在していてもよい。

[0278]

本発明の医薬組成物はまた、水中油エマルジョンの形であってもよい。油相は、植物油またはミネラルオイルまたはこれらの混合物であってもよい。適当な乳化剤としては、天然に生ずるガム、例えば、アラビアゴムまたはトラガントガム、天然に生ずるホスファチド類、例えば、大豆、レクチン、および脂肪酸とヘキシトールから誘導されるエスナルまたは部分エスナル、無水物、例えば、ソルビタンモノオレエート、および前記部分エスナルとエチレンオキシドとの縮合生成物、例えば、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエートが挙げられる。エマルジョンは、甘味料および芳香剤を含んでもよい。

[0279]

シロップおよびエリキシルは、甘味料、例えば、グリセロール、プロピレングリコール、ソルビトール、グルコースまたはショ糖を用いて処方することができる。このような処方、例えば、結着剤、保存剤および甘味料および着色料を含んでもよい。医薬組成物は、滅菌した注射可能な水性または油性の懸濁液の形であってもよい。この懸濁液は、上述した適当な分散剤または懸濁剤を用いて、当該技術分野において知られるように処方することができる。滅菌した注射可能な製品はまた、無毒性の非経口的に許容可能な希釈剤または溶媒中の滅菌した注射可能な溶媒または懸濁液、例えば、1、3-ブタジエンモノールの溶液であってもよい。用いることのできる許容可能なペヒクルおよび溶媒の例は、水、リンゲル溶液および等張塩化ナトリウム溶液である。さらに、滅菌し固定した油を溶媒または懸濁媒体として便利に用いることができる。この目的のためには、任意の非刺激性の固定した油、例えば、合成のモノグリセリドまたはジグリセリドを用いることができる。さらに、脂肪酸、例えば、オレイン酸を注射可能な薬剤の製造において用いることができる。

[0280]

本発明の核酸分子はまた、例えば、薬剤の直腸投与用に、錠剤の形で投与することができる。これらの組成物は、薬剤を、通常の温度では固体であるが直腸温度では液体であり、したがって直腸中で溶融して薬剤を放出する適当な非刺激性賦形剤と混合することにより製造することができる。そのような材料としては、カカオバターおよびポリエチレングリコールが挙げられる。

[0281]

本発明の核酸分子は、滅菌媒体中で非経口的に投与することができる。薬剤は、使用するペヒクルおよび濃度に応じて、ペヒクル中に懸濁されていてもよく、溶解されていてもよい。アジバシト、例えば局所麻酔剤、保存剤および緩衝剤をペヒクル中に溶解することと有利である。

[0282]

上述した健康状態の治療には、体重1キログラムあたり1日あたり約0.1 mg - 約140 mgのオーダーの投与量レベルが有用である(治療者あたり1日あたり約0.5 mg - 約7 g)。担体物質と組み合わせる1回投与量を生産することのできる活性成分の量

は、治療される宿主および投与の特定のモードに依存して様々である。投与量単位形は、一般に、約1mg—約500mgの活性成分を含む。

[0283]

特定の被験者についての特定の投与量レベルは、種々の因子、例えば、用いる特定の化合物の活性、年齢、体重、一般的健康状態、性別、食事、投与時間、投与経路、および排出速度、薬剤の組み合わせ、および治療をしている特定の疾病の重症性に依存することが理解されるであろう。

[0284]

ヒト以外の動物に投与するためには、組成物を動物飼料または飲料水に加えてもよい。動物が治療上適当な量の組成物を飼料とともに接種できるよう、動物飼料および飲用水組成物を処方することが便利であろう。飼料または飲料水に加えるように組成物をブレンドして製造することも便利であろう。

[0285]

本発明の核酸分子はまた、他の治療用化合物と組み合わせる被験者に投与して、全体的治療効果を高めることができる。ある適応症の治療に複数の化合物を用いることにより、副作用の存在を低下させながら有益な効果を高めることができる。

[0286]

1つの態様においては、本発明は、特定の細胞タイプに本発明の核酸分子を投与することにより、特定の組成物を含む。例えば、アシアロ糖蛋白質シグター (ASGP) (Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem., 262, 4429-4432) は、肝細胞に独特であり、分枝鎖ガラクトース末端糖蛋白質、例えばアシアロオロムコイド (ASOR) に結合する。別の例においては、多くの癌細胞中で集積シグターが過剰発現されている。そのような糖蛋白質、合成グリココンジュゲート、または糖蛋白質シグターへの結合は、オリゴサッカライド鎖の分枝の程度に強く依存する親和性で生ずる。例えば、三糖角構造は、二糖角または一糖角より高い親和性で結合する (Baenziger and Fiete, 1980, Cell, 22, 611-620; Connolly et al., 1982, J. Biol. Chem., 257, 939-945)。

Lee and Lee (1987, Glycconjugate J., 4, 317-328) は、ガラクトースと比較してシグターに対してより高い親和性を有するN-アセチル-D-ガラクトースアミンを炭水化物成分として用いることによりこの高い特異性を得た。この“クラスターング効果”はまた、マンノシル末端糖蛋白質またはグリココンジュゲートの結合および取込についても記載されている (Ponpipom et al., 1981, J. Med. Client., 24, 1388-1395)。

ガラクトースアミンまたは糖蛋白質シグターを使用して外来性化合物を細胞膜を超えて輸送することにより、例えば、所疾患、肝臓の癌、または他の癌の治療に糖的化シリバー法を提供することができる。また、バイオコンジュゲートの使用により、治療に必要な治療用化合物の必要用量を低下させることができる。さらに、本発明の核酸バイオコンジュゲートを使用することにより、治療薬の生物利用性、薬力学、および薬物動態学的パラメータを調節することができる。そのようなバイオコンジュゲートの非限定的例は、Varreese et al., 米国特許出願10/201,394, (2001年8月13日出願)；およびMatulic-Adamic et al., 米国特許出願60/362,016 (2002年3月6日出願)に記載されている。

[0287]

あるいは、本発明のある種のsINA分子は、細胞中で真核生物プロモーターから発現させることができる (例えば、Izant and Weintraub, 1985 Science 229, 345; McGarry and Lindquist, 1986 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 399; Scanlon et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 10591-5; Kashani-Sabet et al., 1992 Antisense Res. Dev., 2, 3-15; Dropulic et al., 1992

J. Virol 66, 1432-41; Weerasinghe et al., 1991 J. Virol 65, 5531-4; Ojwang et al., 1992 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10802-6; Chen et al., 1992 Nucleic Acids Res., 20, 4581-9; Sarver et al., 1990 Science 247, 1222-1225; Thompson et al., 1995 Nucleic Acids Res., 23, 2259; Good et al., 1997, Gene Therapy, 4, 45)。当業者は、真核生物細胞中で任意の核酸を適当なDNA/RNAベクターから発現させることができることを認識するのである。そのような核酸の活性は、酵素的核酸によりそれらを一次転写産物から放出させることにより増大させることができる (Drap et al., PCT WO94/02595; Ohkawa et al., 1992 Nucleic Acids Symp. Ser., 27, 15-6; Taira et al., 1991, Nucleic Acids Res., 19, 5125-30; Ventura et al., 1993 Nucleic Acids Res., 21, 3249-55; Chawirra et al., 1994 J. Biol. Chem., 269, 25856)。

[0288]

本発明の別の観点においては、本発明のRNA分子は、DNAまたはRNAベクター中に挿入された転写ユニットから発現させることができる (例えば、Couture et al., 1996, FIG., 12, 510を参照)。組換えベクターは、DNAプラスミドであってもウイルスベクターであってもよい。sINAを発現するウイルスベクターは、限定されないが、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、またはヘルペスウイルスに基づいて構築することができる。別の態様においては、poliIに基づいて構築されたベクターを用いて、本発明の核酸分子を発現させる (例えば、Thompson, 米国特許5,902,880および6,146,886を参照)。sINA分子を発現しうる組換えベクターは、上述のようにシリバーされ、酵素的細胞中に残留することができる。あるいは、核酸分子の過剰発現を与えるウイルスベクターを用いることもできる。そのようなベクターは、必要に応じて繰り返し投与することができる。いったん発現されれば、sINA分子は酵素的mRNAと相互作用して、RNAi応答を生ずる。sINA分子を発現するベクターの輸送は、全身的 (例えば、静脈内または筋肉内投与により)、患者から移植された酵素的細胞に投与した後、被験者に再導入することにより、または所望の酵素的細胞中への導入を可能とする他のいずれかの手段により、行うことができる (総説については、Couture et al., 1996, FIG., 12, 510を参照)。

[0289]

1つの観点においては、本発明は、少なくとも1つの本発明のsINA分子をコードする核酸配列を含む発現ベクターを特徴とする。発現ベクターは、sINAチューブレットス一方または両方の鎖、または自己ハイブリダイズしてsINAデューブレットを生ずる1本の白い相補的鎖をコードすることができる。本発明のsINA分子をコードする核酸配列は、そのsINA分子の発現を可能とする様式で動作可能なように連結することができる (例えば、Paul et al., 2002, Nature Biotechnology, 19, 505; Miyagishi and Taira, 2002, Nature Biotechnology, 19, 497; Lee et al., 2002, Nature Biotechnology, 19, 500; およびNovina et al., 2002, Nature Medicine, 8, 681-686を参照)。

[0290]

別の観点においては、本発明は、以下を含む発現ベクターを特徴とする：a) 転写開始領域 (例えば、真核生物polI, 1, 11または111の開始領域)；b) 転写終了領域 (

例えば真核生物 Pol I, II または III の終止領域) ; および c) 本発明の sIN A 分子の少なくとも 1 つをコードする核酸配列を含み、前記配列は、sIN A 分子の発現 および/またはデリバリーを可能とする様式で、前記開始領域および前記終止領域に動作 可能なように連結されている。ベクターは、任意に、本発明の sIN A をコードする配列 の 5' 側または 3' 側に動作可能なように連結された近白質のオーグメンティングレ ーア (ORF) ; および/またはイントロン (介在配列) を含んでいてもよい。

[0291]

sIN A 分子配列の転写は、真核生物 RNA ポリメラーゼ I (Pol I), RNA ポ リメラーゼ II (Pol II), または RNA ポリメラーゼ III (Pol III) のプロモーターにより推進させることができる。Pol I または Pol II のプロモ ーターからの転写産物は、すべての細胞において高いレベルで発現される。あるタイプの 細胞におけるある Pol I プロモーターのレベルは、近くに存在する遺伝子制御配 列 (エンハンサー、サイレンサー等) の性質に依存する。真核生物 RNA ポリメラーゼ 素が適当な細胞中で発現される限り、真核生物 RNA ポリメラーゼプロモーターもまた用 いられる (Elroy-Stein and Moss, 1990 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 6743-7; Gao and Huang, 1993 Nucleic Acids Res., 21, 2867-72; Lieber et al., 1993 Methods Enzymol., 217, 47-66; Zhou et al., 1990 Mol. Cell. Biol., 10, 4529-37)。何人かの研究者が、そのようなプロモーターから発現した核酸分子が哺乳動物細胞 中で機能しうることを示している (例えば、Kashani-Sabet et al., 1992 Antisense Res. Dev., 2, 3-15; Ojwang et al., 1992 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 10802-6; Chen et al., 1992 Nucleic Acids Res., 20, 4581-9; Yu et al., 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 6340-4; L'Huillier et al., 1992 FMO J., 11, 4411-8; Liszewicz et al., 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 90, 8000-4; Thompson et al., 1995 Nucleic Acids Res., 23, 2259; Sullenger & Cech, 1993, Science, 262, 1566)。より詳細には、転写ユニット、例えば U6 小核 (snRNA)、転移 RNA (tRNA) およびアデノウイルス VA RNA をコードする遺伝子に由来するものは、細胞中において高濃度の所望の RNA 分子 (例えば sIN A) を生成するのに有用である (Thompson et al., (上掲) ; Couture and Stinchcomb, 1996, (上掲) ; Noonberg et al., 1994, Nucleic Acid Res., 22, 2830; Noonberg et al., 米国特許 5,1624,803; Good et al., 1997, Gene Ther., 4, 45; Belcicreiman et al., 国際公開 WO96/18736)。上述の sIN A 転写ユニットは、哺乳動物細胞中に導入するために種々のベクター中に組み込むことができる。ベクターとしては、限定されないが、プラスミド DNA ベクター、ウイルス DNA ベクター (例えばアデノウイルスまたはアデノ随伴ウイルスベクター)、またはウイルス RNA ベクター (例えばシトウイルスまたはアルファウイルスベクター) が挙げられる (総説については、Couture and Stinchcomb, 1996, (上掲) を参照)。

[0292]

別の観点においては、本発明の sIN A 分子の少なくとも 1 つをコードする核酸配列を、その sIN A 分子の発現を可能とする様式で含む発現ベクターを特徴とする。1 つの態様においては、発現ベクターは、a) 転写開始領域; b) 転写終止領域; および c) sIN A 分子の少なくとも一方の鎖をコードする核酸配列を含み; この配列は、sIN A 分子の発現および/またはデリバリーを可能とする様式で、開始領域および終止領

域に動作可能なように連結されている。

[0293]

別の態様においては、発現ベクターは、a) 転写開始領域; b) 転写終止領域; c) オ ーグメンティング領域; および d) sIN A 分子の少なくとも一方の鎖をコードす る核酸配列を含み、この配列は、オーグメンティング領域および/またはデリバリーを可能 なるように連結されており、配列は、sIN A 分子の発現および/またはデリバリーを可能 とする様式で、開始領域、オーグメンティング領域、イントロン、および終止領域に動作可 能なように連結されている。さらに別の態様においては、発現ベクターは、a) 転写開始領域; b) 転写終止領域; c) イントロン; および d) 少なくとも 1 つの sIN A 分子をコード する核酸配列を含み; この配列は、核酸分子の発現および/またはデリバリーを可能とす る様式で、開始領域、イントロンおよび終止領域に動作可能なように連結されている。

[0294]

別の態様においては、発現ベクターは、a) 転写開始領域; b) 転写終止領域; c) イ ントロン; d) オーグメンティング領域; および e) sIN A 分子の少なくとも一 方の鎖をコードする核酸配列を含み、この配列は、オーグメンティング領域の 3' 末端に動作可能なように連結されており、配列は、sIN A 分子の発現および/または デリバリーを可能とする様式で、開始領域、イントロン、オーグメンティング領域 および終止領域に動作可能なように連結されている。

[0295]

HIV の懸念

AIDS (後天性免疫不全症候群) は、1981年に米国で最初に報告され、それ以来、 主要な世界的流行病となった。AIDS は、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) により引 き起こされる。HIV は身体の免疫系の細胞を殺すか傷害を与えることにより、感染およ びある種の痛と戦う身体的能力を進行的に破壊する。AIDS と診断された人々は、通常 は健康な人々と病気にしない微生物、例えばウイルスまたは細菌により引き起こされる、 日和見感染と称される生命を脅かす病にかかりうる。1981年以来、米国では 790, 000 以上の AIDS の症例が報告されており、900, 000 人ものアメリカ人が HIV に感染している。

[0296]

HIV 感染により、慢性的進行性の病気になる。その経過はウイルス複製のレベルの増 加およびより有害なウイルス株の出現により示される。このプロセスは免疫系の破壊を引 き起こす。HIV 感染は、CD4 細胞数および臨床症状により段階に区別される。すべて の人がすべての段階を経て進行するわけではなく、また時間経過も人によって非常に異な る。HIV に感染した後、通常はセロコンバージョン疾患が生じ、次に無症候性期があり、 これは数ヶ月から数年続く (18 年まで、ただし平均は 10 年である)。この後に症候 性期となり、これは進行性免疫不全と相関する。HIV 感染の進行は人により様々であり、 血漿中のウイルス量を測定し、進行の速度を推定するのに重要な代理マーカーである。こ れは RNA コピー/ml で測定される。また、これを用いて、薬剤療法に対する応答を評 価し、薬剤耐性の発達を予測することができる。セロコンバージョンの後、それぞれの人は ウイルス負荷量の設定値を発生させる。ウイルス負荷量が低いほど、HIV 疾 病 (すなわち免疫系の破壊)、最終的な臨床症状および日和見状態の進行は遅い。HIV に感染した人々の 50-90% は急性の臨床疾患を有し、これは典型的には HIV の感 染性曝露の 2-4 週間後に生ずる。症状は非特異的 (ウイルスまたはインフルエンザ様) でありうるため、しばしばこれらのセロコンバージョン疾患は回流的に認識される。多く の者は単核細胞症候群を発症し、これは急性に始まり、2 週間まで続く。症状には、 熱、頭痛、リンパ節症、筋肉痛、発疹、および粘膜皮膚潰瘍化が含まれる。実験室で試験 すればウイルス感染を示すかもしれない。この時点で、HIV に対する抗体はまだ形成さ れていないくても、HIV p24 抗原は検出されうる。この時点ではウイルス負荷量は非常に 高く、セロコンバージョンの間、CD4 数は過渡的に低下する。

【0297】

HIVはレンチウイルスファミリーのレトロウイルスメンバーである。レトロウイルスはエンベロープを有するRNAウイルスであり、逆転写酵素と称されるRNA依存性DNAポリメラーゼを有することと特徴とする。2つのタイプのウイルスがヒトに影響を与えることが知られている。HIV-1はAIDSを引き起こし、世界中で見いだされる。HIV-2はアフリカ人のAIDSの症例において単離されている。

【0298】

ウイルスは、細胞外における形として、直径約100nmの脂質に被覆された円筒形のヌクレオカプシドとして存在する。その脂質エンベロープ中に糖蛋白質が挿入されており、その一部(糖蛋白質 [gp] 120)は、宿主細胞(T-リンパ球ヘルパー細胞、活性化単球およびマクロファージ、およびグリア細胞)のCD4レセプターに結合する結合領域を形成する。ウイルスは、細胞膜と融合し、細胞質内に入った後、そのエンベロープを失い、RNAのDNAへの逆転写が生ずる。

【0299】

ウイルスDNAは、ウイルスのエンボスクレアゼにより、宿主細胞DNA中に潜伏性プロウイルスとしてインテグレートされる。宿主細胞が潜伏的に感染していれば、感染は発症しない。宿主が活動的に感染していれば、プロウイルスDNAが転写され、翻訳され、ウイルス蛋白質およびRNAが産生される。ウイルス蛋白質は集合し、宿主細胞の脂質膜を通して新たなビリオンとして発芽する(リバースエンボスライシス)。ウイルスは発芽または細胞から細胞への移動により播種される。

【0300】

HIV発病の重症度が進行するにつれて、免疫系のすべての成分の異常が見られる。HIV感染の最も重要な結果は細胞媒介性(T細胞)免疫の傷害である。HIVはTヘルパー細胞のCD4レセプターに直接結合し、そのためこのT細胞集団が進行的に減退する。その結果、免疫系は次の能力が低下する:(1)ウイルスに感染した細胞または癌に対する細胞毒性T細胞応答を高める、(2)遅延型過敏性反応を形成する、および(3)新たな外来物質を加工して免疫系に提示する。HIVに感染したほとんどの人では、免疫性侵害の著しい障害が生ずる。HIVは単球およびマクロファージにも感染しうる。

【0301】

したがって、HIV遺伝子を標的とする小干渉核酸分子の使用は、HIV感染およびAIDS、ならびに免疫学的疾患またはHIV遺伝子の調節に応答する他の任意の疾病または病気を治療するために用いることができる一群の新規治療剤を提供する。

【実施例1】

【0302】

以下は本発明の核酸の選択、単離、合成および活性を示す非限定的例である。

【0303】

実施例1: sINACONストラクトのタンデム合成

本発明の例示的sINACON分子は、切断可能なリンカー、例えば、ヌクレオチドリンカーを用いて、タンデムで合成する。本明細書に記載されるタンデム合成の後、1段階精製プロセスを行って、RNA分子を高収率で得る。この方法はハイスループアウトRNAiスクリーニングを変えるsINACON合成に非常に適しており、マルチカラムまたはマルチエルの合成プラットフォームに容易に適合させることができる。

【0304】

5'末端ジメトキシトリチル(5'-O-DMT)基がそのまま残るsINACONおよびその相補鎖のタンデム合成(トリチルオゾン合成)が完了した後、オリゴヌクレオチドを上記のようにして脱保護する。脱保護の後、sINACON配列鎖を自発的にハイブリダイズさせる。このハイブリダイゼーションにより、一方の鎖が5'-O-DMT基を保持し、相補鎖が末端5'-ヒドロキシルを含むデュープレックスが得られる。新たに形成されたデュープレックスは、1つの分子のみがジメトキシトリチル基を有するにもかかわらず、日常的な面相抽出精製(トリチルオゾン精製)の間、単一の分子として振る舞う。これらの

50

鎖は安定なデュープレックスを形成するため、オリゴの対を例えばC18カートリッジを用いて精製するためには、このジメトキシトリチル基(または同等の基、例えば他のトリチル基または他の疎水性成分)のみが必要である。

【0305】

タンデムリンカー、例えば反転デオキシ無塩基ヌクレオチドまたはグリセリルヌクレオチドリンカー(図1を参照)または同等の切断可能なリンカーを導入する時点までは、標準的なホスホアミダイト合成化学を用いる。用いることができるリンカー結合条件の非限定的例には、活性化剤、例えばフロモトリビロリジノホスホニウムヘキサフルオロリン酸(PYBROP)の存在下で、妨害塩基、例えばジイソプロピルエチルアルミン(DIPEA)および/またはDMAPを使用することが含まれる。リンカーを結合させた後、標準的な合成化学を用いて第2の配列の合成を完了し、末端の5'-O-DMT基をそのまま残す。合成後、得られたオリゴヌクレオチドを本明細書に記載される方法にしたがって脱保護し、適当な緩衝液、例えば、50mM NaOAcまたは1.5M NH₄Cl, 11.2% CO₂で反応を停止させる。

【0306】

sINACONデュープレックスの精製は、固相抽出、例えば、1カラム容量(CV)のアセトニトリル、2CVのH₂O、および2CVの50mM NaOAcで調整したWater's C18 Sep Pak 1gカートリッジを用いて、容易に行うことができる。サンプルを負荷し、1CVのH₂Oまたは50mM NaOAcで洗浄する。失敗配列は1CVの14% ACN(水性; 50mM NaOAcおよび50mM NaClを含む)で溶出する。次にカララムを1CVのH₂O等で洗浄し、例えば、1CVの1%水性トリフルオロ酢酸(TFA)をカララムに通し、次にさらに1CVの1%水性TFAをカララムに加えて約10分間放置することにより、カララム上で脱トリチル化を行う。残りのTFA溶液を除き、カララムをH₂Oで、次に1CVの1mM NaClおよび前述のH₂Oで洗浄する。次に、sINACONデュープレックス生成物を、例えば、1CVの20%水性CANを用いて溶出する。

【0307】

図2は、精製したsINACONストラクトのMALDI-TOF質量分析の例を示し、ここで、各ピークはsINACONデュープレックスの個々のsINACON鎖の計算質量に対応する。同じ精製sINACONは、キャピラリー電気泳動(CGE)で分析したときに3つのピークを与える。1つのピークはおそらくデュープレックスsINACONに対応し、2つのピークはおそらく個々のsINACON配列鎖に対応する。同じsINACONストラクトのイオン交換HPLC分析では単一のピークしか示されない。以下に記載されるルソフエラゼンポーターアッセイを用いる精製sINACONストラクトの試験は、別々に合成したオリゴヌクレオチド配列鎖から生成したsINACONストラクトと比較して、RNAi活性が同じであることを示した。

【0308】

実施例2: 任意のRNA配列中の潜在的sINACON標的部位の同定

目的とするRNA標的、例えばウイルスまたはヒトmRNA転写産物の配列を、例えばコンピュータフォールディングアルゴリズムを用いることにより、標的部位についてスクリーニングする。非限定的例においては、Genbank等のデータベースから得られる遺伝子またはRNA遺伝子転写産物の配列を用いて、標的に対して相補性を有するsINACON標的を生成する。そのような配列は、データベースから得ることができるか、または当該技術分野において知られるように実験的に決定することができる。既知の標的部位、例えば、リボザイムまたはアンチセンス等の他の核酸分子を用いた研究に基づいて有効な標的部位であると決定されている標的部位、または疾病または健康状態に関連していることが知られている標的、例えば変異または欠失を含む部位を用いて、これらの部位を標的とするsINACON分子を設計することができる。個々のパラメータを用いて、標的RNA配列中でいすれの部位が最も適当な標的部位であるかを判定することができる。これらのパラメータには、限定されないが、二次または三次RNA構造、標的配列のヌクレオチド塩基

50

組成、標的配列の種々の領域間のホモロジーの程度、またはRNA転写産物中の標的配列の相対的位置が含まれる。これらの判定に基づいて、RNA転写産物中の任意の数の標的部位を選択して、例えば、インビトロRNA切断アッセイ、培養細胞、または動物モデルを用いることにより、効力についてsina分子をスクリーニングすることができる。非限定的例においては、用いるべきsinaコンストラクトのサイズに基づいて、転写産物中のいずれかの位置の1-1000個の標的部位を選択する。当該技術分野において知られる方法、例えば標的遺伝子発現の有効な減少を判定するマルチアルまたはマルチプレートアッセイを用いて、sina分子をスクリーニングするためのハイスループラットフォームニングアッセイを開発することができる。

【0309】

実施例3：RNA中のsina分子標的部位の選択

以下の非限定的工程を用いて、所定の遺伝子配列または転写産物を標的とするsinaを選択を行うことができる。

【0310】

1. 標的配列をインシリコで解析して、標的配列中に含まれる特定の長さのすべてのフラグメントまたはサブ配列、例えば23ヌクレオチドフラグメントのリストを作成する。この工程は、典型的にはあつたPerilスクリプトを用いて行うが、市販の配列分析プログラム、例えば、Oligo、MacVector、またはthe GCG Wisconsin Packageも同様に用いることができる。

【0311】

2. 場合によっては、sinaは2以上の標的配列に対応する。これは、例えば、同じ遺伝子の異なる転写産物を標的とする場合、2以上の遺伝子の異なる転写産物を標的とする場合、またはヒト遺伝子と動物ホモログとの両方を標的とする場合に生じうる。この場合には、それぞれの標的について特定の長さのサブ配列のリストを生成し、次にリストを比較して、各リスト中でマッチング配列を見いだす。次に、サブ配列を、所定のサブ配列を含む標的配列の数にしたがってランク付けする。この目的は、標的配列のほとんどまたはすべてに存在するサブ配列を見いだすことである。あるいは、ランク付けにより、標的配列にユニークなサブ配列、例えば変異体標的配列を特定することができ、このような方法により、変異体配列を特異的に標的とし、正常な配列の発現に影響を及ぼさないsinaの使用が可能となるであろう。

【0312】

3. 場合によっては、sinaのサブ配列は、1またはそれ以上の配列中には存在しないが、所望の標的配列中に存在する。これは、sinaが標的とされないままであるべきパラログスファミリーのメンバーを有する遺伝子を標的とする場合に生じうる。上述のケース2におけるように、それぞれの標的について特定の長さのサブ配列のリストを生成し、次にリストを比較して、標的遺伝子中に存在するが標的ではないパラログ中には存在しない配列を見いだす。

【0313】

4. ランク付けされたsinaサブ配列をさらに分析して、GC含量にしたがってランク付けすることができる。30-70%のGCを含有する部位が好ましく、40-60%のGCを含有する部位がさらに好ましい。

【0314】

5. ランク付けされたsinaサブ配列をさらに分析して、自己フォールディングおよび内部ヘアピンにしたがってランク付けすることができる。内部フォールディングがより強いことが好ましい。強いヘアピン構造は回避すべきである。

【0315】

6. ランク付けされたsinaサブ配列をさらに分析して、配列中にGGGまたはCCCの連続を有するか否かにしたがってランク付けすることができる。いずれかの親にGGG（またはさらに多いG）が存在すると、オリゴヌクレオチド合成に問題が生じることがあり、RNA活性を妨害する可能性がある。したがって、よりよい配列が利用可能であ

る限り、これは回避する。CCCはアンチセンス鎖にGGGを配置するため、標的鎖中で検索する。

【0316】

7. ランク付けされたsinaサブ配列をさらに分析して、配列の3'末端にジュアレオチドUU（ウリジンジュアレオチド）を、および/または配列の5'末端にAA（アンチセンス配列に3' UUを生ずる）を有するか否かにしたがってランク付けする。これらの配列により、末端TTチミンジュアレオチドを有するsina分子を設計することが可能となる。

【0317】

8. 上述のようにランク付けされたサブ配列のリストから4個または5個の標的部位を選択する。次に、例えば、23ヌクレオチドを有するサブ配列において、それぞれの選択された23-merサブ配列の右側21ヌクレオチドをsinaデュープレックスの上側（センス）鎖用に設計し合成し、一方、それぞれの選択された23-merサブ配列の左側21ヌクレオチドの逆相補鎖をsinaデュープレックスの下側（アンチセンス）鎖用に設計し合成する（表1および11を参照）。末端TT残基が配列にとって望ましい場合には（パラグラフ7に記載されるように）、オリゴを合成する前にセンス鎖およびアンチセンス鎖の両方の2つの3'末端ヌクレオチドをTTで置き換える。

【0318】

9. sina分子をインビトロ、培養細胞または動物モデル系においてスクリーニングして、最も活性なsina分子、または標的RNA配列中の最も好ましい標的部位を特定する。

【0319】

別の方法においては、HIV標的配列に特異的なsinaコンストラクトのプールを用いて、HIV RNAを発現する細胞、例えば、B細胞、T細胞、マクロファージおよび内皮細胞培養系において、標的部位についてスクリーニングする。この方法において用いられる一般的な戦略は図9に示される。そのようなプールの非限定的例は、それぞれ、配列番号1-738, 1477-1490, 1499-1506, 1515-1522, 1531-1534, 1539-1546, 1555-1556, 1559-1566, および1575-1576を含むセンス配列、および配列番号739-1476, 1491-1498, 1507-1514, 1523-1530, 1535-1538, 1547-1554, 1557-1558, および1567-1574を含むアンチセンス配列を有する配列を含むプールである。HIVを発現する細胞（例えばA549またはCaco-2細胞）をsinaコンストラクトのプールでトランスフェクトし、HIVの阻害に伴う表現型を示す細胞を分類する。sinaコンストラクトのプールは、適当なベクター中に挿入された細胞カセットから発現させることができる（例えば、図7および図8を参照）。ポジティブの表現型変化（例えば、増殖の低下、HIV mRNAレベルの低下またはHIV蛋白発現の低下）を示す細胞からのsinaをシーケンスして、標的HIV RNA配列中の最も適当な標的部位を決定する。

【0320】

実施例4：HIVを標的とするsinaの設計

sinaの標的部位は、実施例3に記載されるsina分子のライブラリを用いて、あるいは本明細書の実施例6に記載されるようなインベントスsinaシステムを用いて、HIV RNA標的の配列を分析し、任意にフォールディング（sinaの標的へのアクセス可能性を判定するために分析される任意の所与の配列の構造）に基づいて標的部位に優先順位を付けることにより、選択した。HIV-1 RNA標的の配列（例えば、表11に示されるGenbank受託番号）を分析し、任意にフォールディング（sinaの標的へのアクセス可能性を判定するために分析される任意の所与の配列の構造）に基づいて標的部位に優先順位を付けることにより、sinaの標的の部位を選択した。A株およびB株が現在最も優勢な株であるため、HIVのすべての既知のAおよびB株の配列アライメントをホモロジーに基づいてスクリーニングし、これらの株に共通する保存配列を標的と

するよう s i n A 分子を設計した。あるいは、すべての既知の株または他のサブクラスの H I V を同様にホモロジについてヌクレオニングして (表 I V を参照)、相同な配列を標的として用いることができる。異なる株の間の % ホモロジを用いて、考慮すべき 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % または 95 % ホモロジを用いて、考慮すべき標的の数を増加または減少させることができる。表 I に示される配列は、表 I I に示される H I V 株の間の 80 % ホモロジを表す。それぞれの標的配列に結合しうよう s i n A 分子を設計し、任意にコンブユータフオルディンにより個々に分析して、s i n A 分子が標的配列と相互作用しうるか否かを評価する。s i n A 分子の長さを種々に変化させることにより、活性を最適化することができる。表 I に示される s i n A センズ配列 (上側配列) および アンチセンス配列 (下側配列) は、19ヌクレオチドの長さを含み、センス鎖は標的配列と同じ配列を含み、アンチセンス鎖はセンス/標的配列に相補的な配列を含む。センスおよびアンチセンス鎖はさらに、本明細書に記載されるように、ヌクレオチド 3'-オーバーハングを含むことができ、好ましくは、オーバーハングは約 2ヌクレオチドを含む。これは任意に、アンチセンス s i n A 鎖中の標的配列に相補的であってもよく、および/またはセンス s i n A 鎖中に存在する場合に任意に標的配列中の隣接するヌクレオチドに類似していてもよい。一般に、標的 RNA と結合するかさもなくばこれと相互作用する十分な数の相補的ヌクレオチド塩基が選択されるが、種々の長さまたは塩基組成の s i n A デュプレックスに適応させるように、相補性の程度を調節することができ。そのような方法論を用いることにより、s i n A 分子は、任意の既知の RNA 配列、例えば、任意の遺伝子転写産物に対応する RNA 配列中の部位を標的とするよう設計することができる。

【0321】

化学的に修飾された s i n A コンストラクトを設計して、RNAi 活性を媒介する能力を保持しながら、インビボでの全身投与のためのヌクレアーゼ安定性および/または改良された薬物動態学、局在化、およびテリバリ-特性を提供することができる。本明細書に記載される合成方法および一般に当該技術分野において知られる合成方法を用いて、本明細書に記載される化学修飾を合成的に導入する。次に、血清および/または細胞/組織抽出物 (例えば肝臓抽出物) 中で、合成 s i n A コンストラクトをヌクレアーゼ安定性についてアッセイする。合成 s i n A コンストラクトはまた、適当なアッセイ、例えば本明細書に記載されるルシフェラーゼレポートシステムまたは RNAi 活性を定量化する他の適当なアッセイを用いて、RNAi 活性についても平行して試験する。ヌクレアーゼ安定性および RNAi 活性の両方を有する合成 s i n A コンストラクトは、さらに改良された RNA を標的とするいずれかの s i n A 配列に安定化活性 s i n A コンストラクトの化学的修飾を適用して、例えば、標的ヌクレオニングアッセイにおいて用いて、治療薬を開発するための s i n A 化合物のリードを拾い上げることができる (例えば、図 11 を参照)。

【0322】

実施例 5: s i n A の化学合成および精製

s i n A 分子は、RNA マッセンジ中の種々の部位、例えば、本明細書に記載される RNA 配列中の標的配列と相互作用するよう設計することができる。s i n A 分子の一方の鎖の配列は、上述した標的配列に相補的である。s i n A 分子は、本明細書に記載される方法を用いて化学的に合成することができる。対照配列として用いられる不活性 s i n A 分子は、s i n A 分子の配列を標的配列に相補的ではないようにヌクレオチド化することにより、合成することができる。一般に、s i n A コンストラクトは、本明細書に記載するように、固相オリゴヌクレオチド合成方法を用いて合成することができる (例えば、Usman et al., 米国特許 5,804,683;5,831,071;5,998,203;6,117,657;6,353,098;6,362,323;6,437,117;6,469,158;Scarlinge et al., 米国特許 6,111,086;6,008,400;6,111,086 を参照 (いずれもその全体

を本明細書の一部としてここに引用する)。

【0323】

非限定的例においては、RNA オリゴヌクレオチドは、当該技術分野において知られるように、ホスホリアルミダイト化学を用いて段階的様式で合成する。標準的なホスホリアルミダイト化学においては、5'-O-ジメトキシトリチル、2'-O-tert-ブチルジメチルシリル、3'-O-2'-アミノエチル N,N'-ジイソプロピルホスホリアルミダイト基、および環外アミン保護基 (例えば、N6-ベンゾイルアデノシン、N4-アセチルシチジン、および N2-イソブチルグアノシン) のいずれかを含むヌクレオチドを使用している。あるいは、Scarlinge (上掲) により記載されるように、RNA の合成に用いて 2'-O-トリブチルエーテルを不安定性 2'-O-アルトエーテル保護基と組み合わせて用いてもよい。異なる 2' 化学は異なる保護基を必要とし、例えば、Usman et al., 米国特許 5,631,360 (その全体を本明細書の一部としてここに引用する) に記載されるように、2'-デオキシ-2'-アミノヌクレオチドには N-フタロイル保護を用いることができる。

【0324】

固相合成の間に、各ヌクレオチドを順番に (3'-から 5'-方向に) 固相支持体結合オリゴヌクレオチドに付加する。鎖の 3' 末端の最初のヌクレオチドを種々のリンカーを用いて固相支持体 (例えば、調整多孔ガラスまたはポリスチレン) に共有結合させる。ヌクレオチド前駆体、リボヌクレオシドホスホリアルミダイト、および活性化剤を混合して、第 1 のヌクレオシドの 5' 末端上に第 2 のヌクレオシドホスホリアルミダイトをカッパトリンクさせる。次に支持体を洗浄し、未反応 5'-ヒドロキシ基を無水酢酸等のキヤッピンク試薬を用いてキヤッピンクして、不活性な 5'-アセチル成分を得る。次に 3 面リッ結合を酸化してより安定なリン酸結合とする。ヌクレオチド付加サイクルの最後に、適当な条件下で (例えば、トリチル系の基については酸性条件、シリル系の基についてはフッ化物を用いて)、5'-O-保護基を切断する。それぞれの次のヌクレオチドについてこのサイクルを繰り返す。

【0325】

合成条件を改変して、例えば、合成すべき s i n A の特定の化学組成に応じて、異なるカッパトリンク時間、異なる試薬/ホスホリアルミダイト濃度、異なる接触時間、異なる固相支持体および固相支持体リンカー化学を用いることにより、カッパトリンク効率を最適化することができる。s i n A の脱保護および精製は、一般に記載されているように行うことができる (Usman et al., 米国特許 5,831,071, 米国特許 6,353,098, 米国特許 6,437,117, および Bellion et al., 米国特許 6,054,576, 米国特許 6,162,909, 米国特許 6,303,773 (その全体を本明細書の一部としてここに引用する)、または Scarlinge (上掲))。さらに、脱保護条件を改変して、可能な限り最高の収量および純度の s i n A コンストラクトを得る。例えば、本出願人は、2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドは、水性メチルアミンを用いて約 35℃ で 30 分間脱保護する。そのように、2'-デオキシ-2'-フルオロ含有オリゴヌクレオチドがトリボヌクレオチドを含む場合には、水性メチルアミンで約 35℃ で 30 分間脱保護した後、TEA-HF を加え、反応液をさらに 15 分間約 65℃ に維持する。

【0326】

実施例 6: s i n A 活性を評価するための RNAi インビトロアッセイ

RNAi を無細胞システムにおいて再現するインビトロアッセイを用いて、H I V RNA 標的を標的とする s i n A コンストラクトを評価する。アッセイは、Tuschli (1999, Genes and Development, 13, 3191-3197) および Zamora (2000, Cell, 101, 25-33) に記載され、H I V 標的の RNA 用に適合させた系を含む。シグナル阻害薬に由来するシグナルジャムバエ抽出物を用いてインビトロで RNAi 活性を再構築する。標的 RNA は、H I V を発現す

る適当なガラスミドからT7 RNAポリメラーゼを用いてインビトロ転写することにより、または本明細書に記載されるように化学合成により作製する。センスおよびアンチセンス sRNA (例えば各20 μM) は、緩衝液 (例えば、100 mM 酢酸カリウム、30 mM HEPES-KOH, pH 7.4, 2 mM 酢酸マグネシウム) 中で90℃で1分間、次に37℃で1時間インキュベーションによりアンニリングさせ、次に溶解緩衝液 (例えば100 mM 酢酸カリウム、30 mM HEPES-KOH (pH 7.4), 2 mM 酢酸マグネシウム) で希釈する。アンニリングは、アポロースゲルを用いてTBE緩衝液でゲル電気泳動し、臭化エチジウムで染色することによりモニタリングすることができる。シウロゾルハエの溶解物は、Oreogen ハエからの0-2時間齢の胚を用いて調製し、酵母抽査液上に回収し、絨毛膜を除き溶解する。溶解物を遠心分離し、上清を単離する。フッセイは、50% 溶解液 [vol1/vol1], RNA (10-50 pM の最終濃度)、および sRNA (10 nM の最終濃度) を含む10% [vol1/vol1] 溶解緩衝液を含む反応混合物を含む。反応混合物はまた、10 mM のクレアチニン酸、10 μg/ml のクレアチンホスホキナーゼ、100 μM のGTP、100 μM のUTP、100 μM のCTP、500 μM のATP、5 mM のDTT、0.1 U/μL のRNasin (Promega)、および100 μM の各アミノ酸を含む。酢酸カリウムの最終濃度は100 mM に調節する。反応は氷上で予め組立て、25℃で10分間プレインキュベーションした後、RNA を加え、25℃でさらに60分間インキュベートする。4倍量の1.25x Passive Lysis Buffer (Promega) で反応を停止させる。標的RNAの切断は、RT-PCR分析または当該技術分野において知られる他の方法によりフッセイし、反応からsRNAが省略されている対照反応と比較する。

【0327】

あるいは、フッセイ用の内部標識した標的RNAを [アルファ-³²P] CTP の存在下でインビトロ転写により調製し、スピンクロマトグラフィーによりG50セフアデックスカラムを通し、さらに精製することなく標的RNAとして用いる。任意に、標的RNAはT4ポリヌクレオチドキナーゼ酵素を用いて5'-³²P末端標識してもよい。フッセイは上述のようにして行い、標的RNAおよびRNAiにより生成する特異的RNA切断産物をゲルのオートラジオグラフィで可視化する。切断のパーセントは、無標の対照RNAまたはsRNAなしの対照反応からのRNA、およびフッセイにより生成する切断産物を表すバンドをPhosphorImager (登録商標) で定量することにより決定する。

【0328】

1つの態様においては、このフッセイを用いて、sRNA媒介性RNAi切断のためのHIV RNA標的の標的部位を決定する。すなわち、例えば、標識した標的RNAの電気泳動によりフッセイ反応を分析することにより、またはノザンプロットにより、ならびに当該技術分野において知られる他の方法論により、複数のsRNAコンストラクトをHIV RNA標的のRNAi媒介性切断についてスクリーニングする。

【0329】

実施例7: HIV標的のRNAi媒介性の核膜阻害

上述したようにして、ヒトHIV RNAを標的とするsRNA分子を設計し、合成する。これらの核酸分子は、例えば以下の方法を用いることにより、インビトロで切断活性について試験することができる。HIV RNA中の標的配列およびヌクレオチドの位置を表11および111に示される。

【0330】

2つのフオーブットを用いて、HIVを標的とするsRNAの効力を試験する。第1に、例えば、B細胞、T細胞、マクロファージまたは内皮細胞培養系を用いて、細胞培養において試験を試験して、RNAおよび蛋白質の阻害の程度を決定する。本明細書に記載されるように、HIV標的に対するsRNA試験 (例えば、表11および111を参照) を選択する。これらの試験を適当なトランスフェクション試験により、例えば、B細胞、T細胞、マクロファージまたは内皮細胞にデリバリーした後、RNA阻害を測定する。増幅

のリアルタイムPCRモニタリング (例えば、ABI 7700 Taqman (登録商標) を用いて、アクチンに対する標的RNAの相対量を測定する。無関係の標的に対して、または同じ全体の長さおよび化学を有するがそれぞれの位置でランダムに置換されているランダム化sRNA対照に対して作製したオリゴヌクレオチド配列の混合物と比較する。標的に対して一次および二次のリードシーケンスを選択し、最適化を行う。最適なトランスフェクション試験濃度を選択した後、リードsRNA分子を用いてRNAの阻害の経時変化を測定する。さらに、細胞-ブリーチングフオーブットを用いてRNA阻害を決定することができる。

【0331】

sRNAの細胞へのデリバリー

細胞 (例えば、B細胞、T細胞、マクロファージまたは内皮細胞) は、トランスフェクションの前日に、例えば、EGM-2 (BioWhittaker) 中で1x10⁶細胞/ウエルで6-ウエルディッシュに播種する。sRNA (例えば最終濃度20 nM) およびカオニン脂質 (例えば最終濃度2 μg/ml) を、ポリスチレン管でEGM基礎培地 (BioWhittaker) 中で、37℃で30分間複合体化させる。ボルテックスした後、複合体化したsRNAを各ウエルに加え、示される時間インキュベートする。最初の最適化実験のために、例えば、1x10⁵個の細胞を96ウエルプレートに播種し、記載されるようにしてsRNA複合体を加える。sRNAの細胞へのデリバリーの効率は、脂質と複合体化した蛍光sRNAを用いて決定する。6ウエルディッシュ中の細胞をsRNAとともに24時間インキュベートし、PBSですすぎ、2%パラホルムアルデヒド中で室温で15分間固定する。sRNAの取り込みは蛍光顕微鏡を用いて可視化する。

【0332】

Taqmanおよび光サイクラーによるmRNAの定量

sRNAのデリバリーの後、例えば、6ウエル用にはQiagen RNA精製キットを、または96ウエル用にはRneasy抽出キットを用いて、細胞から総RNAを調製する。Taqman分析のために、5'末端に共有結合させたレポート染料 (FAMまたはJOE) および3'末端にコンジュゲート化したクエンチナー染料TAMRAを有する二重標識プローブを合成する。1段階RT-PCR増幅は、例えば、ABI PRISM 7700 Sequence Detectorで、10 μlの総RNA、100 nMのプライマー、900 nMのリバースプライマー、100 nMのプライマー、1XTaqman PCR反応緩衝液 (PE-Applied Biosystems)、5.5 mM MgCl₂、300 μMの各dATP、dCTP、dGTP、およびdTTP、10 UのRNase阻害剤 (Promega)、1.25 UのAmplicon TaqGold (PE-Applied Biosystems) および10 UのM-M LVバーストランスクリプターゼ (Promega) から構成される50 μlの反応液を用いて行う。熱サイクリング条件は、48℃で30分間、95℃で10分間、次に95℃で15秒間および60℃で1分間を40サイクルからなるものでありうる。mRNAレベルの定量は、段階的に希釈した総細胞RNA (300, 100, 33, 11 ng/μl) から生成した標準に対して行い、平行してTaqman反応で測定したβ-アクトニンまたはGAPDH mRNAに対して標準化する。目的とする各遺伝子について、上側プライマーおよび下側プライマー、および蛍光標識したプローブを設計する。特定のPCR産物中へのSYBR Green I染料のリアルタイム取り込みは、ガラスキャピラリー管で光サイクラーを用いて測定することができる。対照cRNAを用いて、各プライマー対について標準曲線を作成する。値は、各サンプルにおいてGAPDHに対する相対的表現として表す。

【0333】

フェーストプロトタイプ

核抽出物は、標準的なフェイクロ調製手法 (例えば、Andrews and Fallier, 1991, Nucleic Acids Research, 19, 2499を参照) を用いて調製することができる。例えばTCA沈殿を用いて、上清からの蛋白質抽出

物を調製する。等量の2.0% TCAを細胞上清に加え、氷上で1時間インキュベートし、5分間の遠心分離によりペレット化する。ペレットをアセトンで洗浄し、乾燥し、氷に再懸濁する。細胞蛋白質抽出物を10% Bistris NuPage (核抽出物) または4-12% Tris-グリシン (上清抽出物) ボリアクリルアミドゲルに流し、ニトロセルロース膜に移す。非特異的結合を、例えば、5% 無脂乳とともに1時間インキュベートすることによりブロッキングすることができ、次に一次抗体で4℃で16時間反応させる。洗浄した後、二次抗体、例えば (1:10, 0.00希釈) を室温で1時間適用し、Super Signal 試薬 (Pierce) でシグナルを検出する。

【0334】

実施例8: HIV選伝子発現のダウンスケーリングを評価するのに有用なモデル細胞培養

当該技術分野において一般に知られるように、本発明のsinaコンストラクトを種々の細胞培養系において用いて、抗HIV活性を有する化合物をスクリーニングすることができる。B細胞、T細胞、マクロファージおよび内皮細胞培養系は、本発明のsina分子のスクリーニングに容易に適合させることができる細胞培養系の非限定的例である。非限定的例においては、本発明のsina分子は、Lee et al. (2002, Nature Biotechnology, 19, 500-505) に記載されるように、UG snRNAプロモーター-推進性発現系を用いて、HIV-1 pNL4-3プロウイルスDNAとともに293/EcR細胞にコトランスフェクションする。

【0335】

非限定的例においては、Lee et al. (上掲) に記載されるように、sina発現ベクターはpTZU6+1ベクターを用いて以下のように製造する。一方のカセットは21ヌクレオチドのセンス配列を有し、他方は21ヌクレオチドのアンチセンス配列 (表1) を有する。これらの配列は、本明細書に記載されるHIV-1 RNA標的を標的とするよう設計する。sinaメカニズムを確認するための対照として、HIV-1 (S/AS (IR)) に相補性を有しない無関係のセンスおよびアンチセンス (S/AS) 配列をpTZU6+1中にサテライトコトランスフェクションする。sinaまたは対照コンストラクトで誘導するRNAはまた、HIV-1 pNL4-3プロウイルスDNAと調製し、ポナステロンで誘導する。RNAはまた、HIV-1 pNL4-3プロウイルスDNAと調製する。sinaまたは対照コンストラクトでコトランスフェクションした293細胞から調製する。sinaの抗HIV-1活性を測定するためには、上述したように、sinaコンストラクトおよび感染性HIV-1プロウイルスDNAであるpNL4-3で293細胞をコトランスフェクションし、当該技術分野において知られるようにノザンブロット分析を行うことにより、過渡的アッセイを行う。例えば、Dynatech MR5000 ELISAプレートリーダー (Dynatech Labs, Inc., Chantilly, VA) を利用してp24の値を計算する。細胞生存率はまた、トランスフェクションの4日後にトリパンブルー染料排除カウントを用いて評価する。

【0336】

抗HIV活性を有する化合物をスクリーニングするための他の細胞培養モデル系は当該技術分野において知られている。例えば、Duzgunes et al. (2001, Nucleic Acids, Nucleotides & Nucleic Acids, 20 (4-7), 515-523), Cagnun et al. (2000, Antisense Nucleic Acid Drug Dev., 10, 251), Ho et al. (1995, Stem Cell, 13, supp. 3, 100) およびBaur et al. (1997, Blood, 89, 2259) は、本発明の組成物および本明細書に記載されるアッセイにおいて用いるために容易に適合させることができる細胞培養系を記載する。

【0337】

動物モデル

動物モデルにおいて抗HIV剤の効力を評価することは、ヒトの臨床試験の重要な前提条件である。本発明のsinaコンストラクトは、種々の動物モデルにおいて評価するこ

とができ、これらには、例えば、中空HIVモデル (例えば、Greenberg, 米国特許5, 627, 070を参照)、CD4プロモーターおよびエンボサースモデル (HIV-1選伝子を発現するトランスジェニックマウスを用いるAIDS用のマウスモデル (例えば、Jolicœur, 国際公開WO98/50535を参照)、および/またはHIV/SIV/SHTV非ヒト霊長類モデル (例えば、Narayan, 米国特許5, 849, 994を参照) が含まれる。sina化合物およびウイルスは、本明細書に記載される、当該技術分野において知られるように、種々の方法および経路で投与することができる。これらのモデルにおける結果の定量は、種々の方法、例えば、定量的PCR、定量的およびバルク培養アッセイ、血漿培養アッセイ、抗原および抗体検出アッセイ、リンパ球増殖、細胞内サイトカイン、フローサイトメトリ、ならびに血液学およびCBC評価により行うことができる。さらに別の動物モデルは当該技術分野において一般に知られている。例えば、Baird et al. (2000, Mol. Ther., 1, 244) を参照。

【0338】

実施例9: HIV RNA発現のRNAi媒介性阻害

sinaコンストラクト (表1) を、例えば、293細胞において、HIV RNA発現を減少させる効力について試験する。トランスフェクションの時点で細胞が70-90% コントロールであるように、トランスフェクションの約24時間前に、96ウェルプレートに5, 000-7, 500細胞/ウェル、100μl/ウェルで細胞を播種する。トランスフェクションのために、アニーリングしたsinaを50μl/ウェルの容量でトランスフェクション試薬と混合し、室温で20分間インキュベートし、HIV-1 pNL4-3プロウイルスDNAとともに293細胞にコトランスフェクションする。sinaコンストラクト/ウイルス混合物を細胞に加えて、150μlの容量で最終sina濃度を25nMとする。各sinaコンストラクト/ウイルス混合物を3回のsina処理用3つのウェルに加える。細胞をsinaコンストラクト/ウイルス混合物の連続的存在下で37℃で24時間インキュベートする。24時間において、処理した細胞の各ウェルからRNAを調製する。まずトランスフェクション混合物を有する上清を除去して廃棄し、次に細胞を溶解し、各ウェルからRNAを調製する。処理後の遺伝子の発現を、標的遺伝子および標準化用に対照遺伝子 (36B4, RNAポリメラーゼサブユニット) についてRT-PCRにより評価する。さらに、ELISAを用いてHIV-1 p24ウイルス抗原レベルを測定することができる。3回の実験のデータを平均し、各処理について標準偏差を求める。標準化したデータをグラフに表し、活性なsinaによる標的mRNAの減少のパラメータをそれぞれの反転対照sinaと比較して判定する (例えば、Lee et al., 2002, Nature Biotechnology, 20, 500-505を参照)。

【0339】

非限定的例においては、リボヌクレオチドおよび3' 末端ジチモジンを含むsinaコンストラクト、ならびに、2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドおよびグリニルヌクレオチドを含む、sinaのセンス鎖が5' および3' 末端反転デオキシ無塩基キヤップでさらに修飾されており、アンチセンス鎖が3' 末端ホスホチオエーキヌクレオチド間結合を含む、化学的に修飾されたsinaコンストラクトをアッセイする。表1Vに記載されるさらに別の安定な化学についても同様に活性をアッセイする。これらのsinaコンストラクトを、適当なマッピングした化学的反転対照と比較する。さらに、sinaコンストラクトはまた、未処理細胞、脂質およびスクラブル化sinaコンストラクトでトランスフェクトした細胞、および脂質のみでトランスフェクトした細胞 (トランスフェクション対照) とも比較する。

【0340】

実施例10: 適応症

HIV研究における現在の知識は、研究、診断、および治療用途のために、HIV活性をアッセイする方法、およびHIV発現を制御しうる化合物が必要とされていることを示す。本明細書に記載されるように、本発明の核酸分子は、アッセイにおいてHIV

レベルに関連する疾病状態を診断するために用いることができる。さらに、核酸分子は、HIVレベルに関連する疾病状態を治療するために用いることができる。

【0341】

単独で、または他の療法との組み合わせで、HIV発現の調節に関連しうる特定の変性性および疾病状態としては、限定されないが、後天性免疫不全症候群(AIDS)および関連する疾病および状態、例えば、限定されないが、カボシ肉腫、リンパ腫、子宮頸癌、扁平上皮癌、心筋障害、リウマチ性関節炎、および日和見感染、例えば、Pneumocystis carinii, サイトメガロウイルス、ヘルペス単純ウイルス、ミコプラズマ、クリプトコッカス、トキソプラズマ、進行性多病巣性脳神経障害(パボウイルス)、ミコプラズマ、アスペルギルス、クリプトコッカス、カンジダ、クリプトスポリジウム、Isospora belli, ミクロスポリジウム、および細胞または組織中のHIVのレベルに関連するがそれに応答するであろう他の任意の疾病または状態が含まれる。

【0342】

HIV研究における現在の知識は、研究、診断、および治療用途のために、HIV活性をアッセイする方法およびHIV発現を制御しうる化合物が必要とされていることを示す。

【0343】

抗ウイルス化合物、モノクローナル抗体、化学療法剤、放射線療法、鎮痛剤、および/または抗炎症性化合物の使用はすべて、本発明の核酸分子(例えば、リボサイルムおよび/またはリボセンス分子)と組み合わせるが併用しうる方法の非限定的例である。本発明の核酸分子と併用しうる抗ウイルス化合物の例としては、限定されないが、AZT(ジドジノキシリン)、ddI(ジドデオキシイリジン)、ddC(zalcitabine)、ddI(ジドデオキシイリジン)、dT(stavudine)、および3TC(lamivudine)リバビリン、デルバリジン(Rescriptor)、ネビラピン(Viramune)、エトラビリン(Sustiva)、リトナビル(Norvir)、ザナビル(In Virase)、インジナビル(Crixivan)、アプタラビル(Agenera)、ネルブイナビル(Viracept)、および/またはロピナビル(Kaletra)が挙げられる。本発明の核酸分子と組み合わせることができる慣用的な化学療法剤には、結核菌を殺すための細胞毒性剤の種々の組み合わせが含まれる。これらの薬剤としては、限定されないが、バクリタキセル(タキソール)、ドセタキセル、シスプラチン、メトトレキサート、シクロホスファミド、ドキソルビン、フルオロウラシル、カルボプラチン、エタトトレキサート、ゲムシタジンおよび/またはリボセンス分子(例えば、リボザイルム、sRNAおよびリボセンス分子)と容易に組み合わせることができる。したがって本発明の範囲内であることを理解するであろう。

【0344】

実施例13: 診断用途

本発明のsRNA分子は、種々の応用において、例えば、臨床、工業、環境、農業および/または研究の設定において、種々の診断用途、例えば分子標的(例えばRNA)の同定に用いることができる。そのようなsRNA分子の診断における使用は、再構成されたRNAi系、例えば、細胞溶解剤または部分的に精製された細胞溶解剤を利用することを含む。本発明のsRNA分子を診断手段として使用し、疾病に罹患した細胞内の遺伝的浮動および変異を検査するか、または細胞内において内因性または外来の(例えばウイルス)RNAの存在を検出することができる。sRNA活性と標的RNAの構造との間の密接な関係により、分子のいずれの領域においても、標的RNAの塩基対形成および3次元構造を変更する変異を検出することができる。本発明に記載されるsRNA分子を複数使用することにより、インビトロならびに細胞および組織におけるRNAの構造および機能に重要なヌクレオチド変異をアッセイすることができ、sRNA分子による特定の遺伝子産物の役割を明らかにすることができる。このようにして、他の遺伝子標的を疾病の重要

な介在物として明らかにすることができる。これらの実験は、組み合わせ療法の可能性を提供することにより、疾病進行のよりよい治療につながるであろう(例えば、異なる遺伝子を標的とする多数のsRNA分子、既知の小分子阻害剤と組み合わせさせたsRNA分子、sRNA分子および/または他の化学的または生物学的分子と組み合わせさせた間欠的治療)。本発明のsRNA分子の他のインビトロにおける使用は当該技術分野においてよく知られており、これには、疾病、感染または関連する健康状態に伴うmRNAの存在の検出が含まれる。そのようなRNAは、sRNA分子で処理した後、標準的な方法論、例えば蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を使用して切断産物の存在を判定することにより検出する。

【0345】

特定の例においては、標的RNAの野生型または変異型のみが切断できないsRNA分子をアッセイに使用する。第1のsRNA分子(すなわち、野生型の標的RNAのみを切断するもの)を用いて試料中の野生型RNAの存在を同定し、第2のsRNA分子(すなわち、変異型の標的RNAのみを切断するもの)を用いて試料中の変異型RNAを同定する。反応対照として、野生型および変異型の両方のRNAの合成基質を両方のsRNA分子で切断し、反応におけるsRNA分子の相対効率および"非標的"RNA種を切断しないことを明らかにする。合成基質からの生成にも役立つ。したがって、それぞれの分析は2つのsRNA分子、2つの基質、および1つの未知の試料を必要とし、これらを組み合わせる6つの反応を行う。切断産物の存在をRNAase保護アッセイを用いて確認し、各RNAの完全長および切断フラグメントをポリアクリルアミドゲルのレーンで分析できるようにする。標的細胞における変異型RNAの発現および所望の表現型の変化の推定されるリスクへの洞察を得るために、必ずしも結果を定量化する必要はない。その蛋白質産物が変異型(すなわち、疾病に関連する)または感染に関連する)の発生に関与することが示唆されるmRNAの発現は、RNAレベルの定量的比較で十分であり、初期の診断のコストが低減する。RNAレベルを定量的に比較するにしても定量的に比較するにしても、より高い変異型と野生型の比率はより高いリスクと相関関係があるであろう。

【0346】

本明細書において言及されるすべての特許および刊行物は、本発明の属する技術分野の技術者のレベルを示す。本明細書において引用されるすべての参考文献は、それぞれの参考文献が個々にその全体が本明細書の一部としてここに引用されることと同じ程度に、本明細書の一部として引用される。

【0347】

当業者は、本発明が、その目的を実施し、記載される結果および利点、ならびに本明細書に固有のものを得るためによく適合していることを容易に理解するであろう。本明細書に記載される方法および組成物は、現在のとおり好ましい態様の代表的なものであり、例示的なものであつて、本発明の範囲を限定することを意図するものではない。当業者は、特許請求の範囲において定義される本発明の精神の中に包含される変更および他の用途をなすであろう。

【0348】

当業者は、本発明の範囲および精神から逸脱することなく、本明細書に開示される本発明に対して種々の置換および変更をなすことが可能であることを容易に理解するであろう。すなわち、そのような追加の態様は、本発明および特許請求の範囲の範囲内である。本発明は、RNAi活性を有する改良された活性を有する核酸コンストラクトを得るために本明細書に記載される化学的修飾の種々の組み合わせおよび/または置換を試験することとを当業者は教示する。そのような改良された活性は、改良された安定性、改良された生物利用性、および/またはRNAiを媒介する細胞応答の改良された活性化を含むことができる。したがって、本明細書に記載される特定の態様は限定ではなく、当業者は、改良されたRNAi活性を有するsRNA分子を同定するために、過度の実験なしに本明細書

に記載される修飾の特定の組み合わせを試験しうることを容易に理解することができる。

【0349】

本明細書に例示的に記載されている発明は、本明細書に特定の開示されていない任意の要素または限定なしでも適切に実施することができる。すなわち、例えば、本明細書における各例において、“...を含む”、“...から本質的になる”および“...からなる”の用語は、他の2つのいずれかと置き換えることができる。本明細書において用いられる用語および表現は、説明の用語として用いるものであり、限定ではない。そのような用語および表現の使用においては、示されかつ記載されている特徴またはその一部の等価物を排除することを意図するものではなく、特許請求の範囲に記載される本発明の範囲中で種々の変更改可能であることが理解される。すなわち、好ましい態様および任意の特徴により本発明を特定の開示してきたが、当業者には本明細書に記載される概念の変更改および変換が可能であり、そのような変更改および変換も特許請求の範囲に定義される本発明の範囲内であると考えられることが理解されるべきである。

【0350】

さらに、発明の特徴および観点がワーカッシュグループまたは他の代替グループの用語で記載されている場合、当業者は、本発明が、ワーカッシュグループまたは他のグループの個々のメンバーまたはサブグループに関連してもまた記載されていることを認識するであろう。

【0351】

10

【表1】

表1: HIV 受託番号

受託番号	名前	サブタイプ
AB032740	95TNIH022	01 AE
AB032741	95TNIH047	01 AE
AB052895	93JPNH1	01 AE
AB070352	NH25 93JPNH25T 93JPNH25T	01 AE
AB070353	NH2 93JPNH2ENV	01 AE
AF164485	93TH021	01 AE
AF197338	93TH057	01 AE
AF197339	93TH065	01 AE
AF197340	90CF11697 AF197340	01 AE
AF197341	90CF4071 AF197341	01 AE
AF289954	CM235-2	01 AE
AF289955	CM235-4	01 AE
AY008714	97CNGX2F 97CNGX-2F	01 AE
AY008718	97CNGX11F	01 AE
U51188	90CF402 90CF402 CAR-E 4002	01 AE
U51189	93TH253	01 AE
U54771	CM240	01 AE
AF369964	NP1623	01B
AV082968	TH1328 AV082968	01B
ALJ04325	97DCKTB49 97DCKTB49	01GHJKU
AB049811	HIM404325	02 AG
AB052867	AB052867	02 AG
AF063223	DJ263	02 AG
AF063224	DJ264	02 AG
AF107770	SE7812	02 AG
AF184155	Q829	02 AG
AF377954	CM52865 AF377954	02 AG
AF377955	CM53668 AF377955	02 AG
AL251056	MP1211 98SE-MP1211	02 AG
AL251057	MP1213 98SE-MP1213	02 AG
AL286133	97CMA-MP807	02 AG
L39106	IBNG	02 AG
AF193276	KAL153-2	03 AB
AF193277	RUG8001 98RU001	03 AB
AF414006	98BY10443 AF414006	03 AB
AF048337	94CY032-3 CY032-3	04 GYX
AF119819	97PVMY GR84	04 GYX
AF119820	97PVMY GR11	04 GYX
AF076998	VH61	05 DF
AF193253	V1310 AF193253	05 DF
AF064699	BFP90	06 GYX
AL245481	95TML24	06 GYX
AL288981	97SE1078	06 GYX
AL288982	95ML127	06 GYX
AF286226	97CND01 C54	07 BC
AF286230	98CND09	07 BC
AX149647	C54A C54	07 BC
AX149672	C54D AX149672	07 BC
AX149771	CN54b	07 BC
AX149898	C54C	07 BC

10

20

30

40

50

【表 2】

AF286229	98CND08	08 BC
AF008715	97CNGX6F	08 BC
AY008716	97CNGX7F	08 BC
AY008717	97CNGX9F	08 BC
AF289548	96T2BF061	10 CD
AF289549	96T2BF071	10 CD
AF289550	96T2BF10	10 CD
AF179368	GR17	11 GPX
AJ291718	MP818	11 GPX
AJ291719	MP1298	11 GPX
AJ291720	MP1307	11 GPX
AF389594	UFTT23	12 BF
AF389595	UFTT35	12 BF
AF389596	ARMA159	12 BF
AF408629	A32879 AF408629	12 BF
AF408630	A32899 AF408630	12 BF
AY037279	ARMA185	12 BF
AF423756	X397 AF423756	14 BG
AF423757	X421 AF423757	14 BG
AF423758	X475 AF423758	14 BG
AF423759	X477 AF423759	14 BG
AF450096	X805 AF450096	14 BG
AF450097	X823 AF450097	14 BG
AF089699	SE8938	A
AF089671	SE7535	A
AF089673	SE8691	A
AF107771	UGSE8131	A
AF193275	97BL06 AF193275	A
AF361872	97T202 AF361872	A
AF361873	97T203 AF361873	A
AF413987	98UJ0116 AF413987	A
AF004885	C23-17	A1
AF069670	SE7293	A1
M82320	U465 U465A	A1
U51190	92UG037	A1
AF286237	94CY01741	A2
AF286238	97CDKTB48	A2
U86780	ZAM184	A2C
AF286239	97KG004	A2D
AF318544	97CDKFS8	A2G
AF087166	95IN21301	AC
AF071474	SE9488	AC
AF361871	97T201 AF361871	AC
AF361878	97T208 AF361878	AC
AF361879	97T208 AF361879	AC
AF361879	97T209 AF361879	AC
U88923	92RW009	AC
AF075702	SE8603	ACD
AJ276595	VH1035	ACG
AF071473	SE7108	AD
AF075701	SE8954	AD
AJ237565	97N0GIL3	ADHK
X04415	MAL MALCG	ADK
AF377959	CM53379 AF377959	AFGHU
AF377957	CM53392 AF377957	AG

【表 3】

AJ276595	VH1197	AG
U88925	92NG003	AG
AF076474	V1354	AGHU
AF192135	BW2117	AGU
AJ293865	B76 HILM293865	AGU
AF099572	SE6994	AU
A04321	11B LAI	B
AB078005	ARE52 AB078005	B
AF003887	WC001	B
AF003888	NL43WC001	B
AF004394	AD87 ADA	B
AF033819	HXB2-cody LAI	B
AF042100	MBC200	B
AF042101	MBC925	B
AF042102	MBC18 MBC18	B
AF042103	MBC54	B
AF042104	MBC98	B
AF042105	MBCD36	B
AF042106	MBC18R01 C18R01	B
AF049494	499LC16	B
AF049495	NC7	B
AF059140	DH123	B
AF070521	NL43E9 LAI HILM15	B
AF075719	MNTQ MNDometo	B
AF089817	THCYS LMA9	B
AF146728	VH	B
AF224507	WK	B
AF256204	S6111 AF256204	B
AF256205	S61D15 AF256205	B
AF256206	S61G1 AF256206	B
AF256207	S61G7 AF256207	B
AF256208	S61115 AF256208	B
AF256209	S61K1 AF256209	B
AF256210	S61K15 AF256210	B
AF256211	S61D1	B
AF286365	WF27	B
AJ006287	89SP061 89ES061	B
AJ271445	GB8 GB8-46R HILM271445	B
AJ078307	BH10	B
AY047268	ARCH054	B
AY037289	ARMIS08	B
AY037270	BOL122	B
AY037274	ARMA173	B
AY037282	ARMA132	B
D10112	CAM1	B
DB8058	MCK1	B
DB6059	PM213	B
K02007	SF2 LAV2 ARV2	B
K02013	LAI BRU	B
K02083	PV22	B
K03455	HXB2 HXB2CG HXB2H LAI	B
L02317	BC BCSG3	B
L31963	TH4754 LAI	B
M15654	BH102 BH10	B
M17449	MNCG MN	B

【表 4】

M7451	RF HAT3	B
M7921	NL43 NL43 NL4-3	B
M6727	OYL 397	B
M6849	JRCSE JR-CSF	B
M69431	NYECO	B
M63258	YU2 YU2X	B
M63259	YU10	B
NG-001802	HXB2H	B
U12055	LW123	B
U21135	WEALU60 GHOSH	B
U23487	contaminant MANC	B
U26546	WRZ7	B
U26942	NL4-3 LAI/NY5 NL43 NL43	B
U34603	H0320-2A12 ACH3202A12	B
U34604	3202A21 ACH3202A21	B
U37270	C18MBC	B
U39362	P898 89.6	B
U43098	D81	B
U43141	HAN	B
U63832	JRFL JR-FL	B
U65854	85WCI PR54	B
U65855	WCI PR854	B
U68886	WCI PR8546	B
U69387	WCI PR8552	B
U69589	WCI PR855	B
U69590	WCI PR9011	B
U69591	WCI PR9012	B
U69592	WCI PR9018	B
U69593	WCI PR9031	B
U69593	WCI PR9032	B
U71182	FL42	B
X01762	REHTLV3 LAI IIB	B
Z11530	F12CG	B
AF332867	A027 AF332867	BF
AF408626	A025 AF408626	BF
AF408627	A047 AF408627	BF
AF408628	A063 AF408628	BF
AF408631	A050 AF408631	BF
AF408632	A32878 AF408632	BF
AF037286	ARCH014	BF
AF037287	AFCH003	BF
AF037271	BOL137	BF
AF037272	UTRI17	BF
AF037273	AFMA092	BF
AF037275	AFMA096	BF
AF037276	AFMA070	BF
AF037277	AFMA037	BF
AF037278	AFMA008	BF
AF037280	AFMA097	BF
AF037281	AFMA039	BF
AF037283	AFMA029	BF
AF005495	53BF029.4	BF1
AF423755	X254 AF423755	BG
AB023804	93IN101	C
AF067154	93IN988 301989	C

【 0 3 5 5 】

50

【表 5】

AF067155	95IN21068	C
AF067157	93IN504 301904	C
AF067158	93IN505 301905	C
AF067159	94IN11246	C
AF110959	96BW01B03 96BW01B03	C
AF110960	96BW01B21	C
AF110961	96BW01B22	C
AF110962	96BW0402	C
AF110963	96BW0407	C
AF110964	96BW0408	C
AF110965	96BW0409	C
AF110966	96BW0410	C
AF110967	96BW0502	C
AF110968	96BW0504	C
AF110969	96BW1104	C
AF110970	96BW1106	C
AF110971	96BW11B01	C
AF110972	96BW1210	C
AF110973	96BW15B03	C
AF110974	96BW15C02	C
AF110975	96BW15C05	C
AF110976	96BW15B01	C
AF110977	96BW16D14	C
AF110978	96BW1626	C
AF110979	96BW17A09	C
AF110980	96BW17B03	C
AF110981	96BW17B05	C
AF286223	94IN476	C
AF286224	96ZM651	C
AF286225	96ZM751	C
AF286227	97ZAO12	C
AF286231	98BH004	C
AF286232	98IN022	C
AF286233	98IS002	C
AF286234	98TZ013	C
AF286235	98TZ017	C
AF290027	96BW06H51 96BW06-H51	C
AF290028	96BW06.4	C
AF290029	96BW06J7 AF290029	C
AF290030	96BW06K18 AF290030	C
AF321523	ML4	C
AF361874	97TZ04 AF361874	C
AF361875	97TZ05 AF361875	C
AF443074	96BWM015	C
AF443075	96BWM032 AF443075	C
AF443076	96BWM032 AF443076	C
AF443077	96BWM034 AF443077	C
AF443078	96BWM034 AF443078	C
AF443079	96BWM0410 AF443079	C
AF443080	96BWM018D5 AF443080	C
AF443081	96BWM036A5 AF443081	C
AF443082	96BWM037D5 AF443082	C
AF443083	96BW138212 AF443083	C
AF443084	96BW46424 AF443084	C

【 0 3 5 6 】

50

【表 6】

AF443085	99BW47458 AF443085	C
AF443086	99BW47547 AF443086	C
AF443087	99BWMC168 AF443087	C
AF443088	00BW07821 AF443088	C
AF443089	00BW07820 AF443089	C
AF443090	00BW087421 AF443090	C
AF443091	00BW147127 AF443091	C
AF443092	00BW16182 AF443092	C
AF443093	00BW1686 00BW16868 AF443093	C
AF443094	00BW17593 AF443094	C
AF443095	00BW17732 AF443095	C
AF443096	00BW17835 AF443096	C
AF443097	00BW17956 AF443097	C
AF443098	00BW18113 AF443098	C
AF443099	00BW18695 AF443099	C
AF443100	00BW18802 AF443100	C
AF443101	00BW192113 AF443101	C
AF443102	00BW20361 AF443102	C
AF443103	00BW20636 AF443103	C
AF443104	00BW20872 AF443104	C
AF443105	00BW2127214 AF443105	C
AF443106	00BW21283 AF443106	C
AF443107	00BW22767 AF443107	C
AF443108	00BW38193 AF443108	C
AF443109	00BW38428 AF443109	C
AF443110	00BW38713 AF443110	C
AF443111	00BW38789	C
AF443112	00BW38868	C
AF443113	00BW38916	C
AF443114	00BW39702	C
AF443115	00BW50311	C
AY043173	DU151 AY043173	C
AY043174	DU179 AY043174	C
AY043175	DU422 AY043175	C
AY043176	CTSC2 AY043176	C
U48016	ETH2220 C2220	C
U52953	92BH7025	C
AF361877	97TZ07 AF361877	CD
AY074891	00BWMOC51 AY074891	CD
AF133821	MB2059	D
AJ320484	HMS320484	D
K03454	ELI	D
M22639	Z226 Z2 CDC-Z34	D
M27323	NDK	D
U88822	84ZRH085	D
U88824	94UG1141	D
AF005494	93RF020.1	F1
AF075703	FIN563	F1
AF077336	VIB50	F1
AJ249238	MP411 98FRMP411	F1
AF377956	CMS3657 AF377956	F2
AJ249236	MP285 95CMMP285	F2
AJ249237	MP267 95CMMP267C	F2
AF076475	VH1126	FKU
AF061940	HH8793-1.1	G

【 0 3 5 7 】

【表 7】

AF061641	HH8793-12.1	G
AF061642	SE6166 G6165	G
AF084936	DRCBL	G
AF423760	X558 AF423760	G
AF450098	X138 AF450098	G
U88826	92NG083 JV10832	G
AF005486	90CF056 90CF056	H
AF190127	V1991	H
AF190128	V1997	H
AF082394	SE7887 SE92809	J
AF082395	SE7022 SE9173	J
AJ249235	EQTB11C97Z-EQTB11C	K
AJ249239	MP535 96CMMP535C	K
AJ230063	97CA-MP645MO	MO
AJ008022	YBF30	N
AJ271370	YBF106	N
AF407418	VAU AF407418	O
AF407419	VAU AF407419	O
AJ302646	SEMP1299 HMA302646	O
AJ302647	SEMP1300 HMA302647	O
L20571	MP5180	O
L20587	ANT70	O
NC 002787	SEMP1299 NC 002787	O
AF286236	83CD003 Z3 AF286236	U
AF457101	90CD121E12 AF457101	U
AY046058	GR303 99GR303 AY046058	U

【 0 3 5 8 】

表 II: HIV siNA および標的配列

標的配列	配列番号	上側配列	配列番号	下側配列	配列番号
UUUGGAAAGGACCAGCAAA	1	UUUGGAAAGGACCAGCAAA	1	UUUGCUGGUCUUUCCAAA	739
CAGGAGCAGAUACAGU	2	CAGGAGCAGAUACAGU	2	ACUGUAUACUCUGCCUCG	740
AGAAAAGGGGGGAUUGGGG	3	AGAAAAGGGGGGAUUGGGG	3	CCCCAAUCCCCCUUUUCU	741
GUAGACAGGAUAGGAUUA	4	GUAGACAGGAUAGGAUUA	4	UAAUCCUACUCUGUCUAC	742
ACAGGAGCAGAUACAG	5	ACAGGAGCAGAUACAG	5	CUGUAUACUCUGCCUCG	743
GAAAAGGGGGGAUUGGGG	6	GAAAAGGGGGGAUUGGGG	6	CCCCAAUCCCCCUUUUC	744
UUAGAUACAGGAGCAGAU	7	UUAGAUACAGGAGCAGAU	7	CAUCUGCUCUGUAUCUAA	745
UAGAUACAGGAGCAGUA	8	UAGAUACAGGAGCAGUA	8	UCAUCUGCUCUGUAUCUA	746
AGCAGAAGACAGUGGCAU	9	AGCAGAAGACAGUGGCAU	9	AUUGCCACUGUCUUCUGCU	747
AUUAGAUACAGGAGCAGAU	10	AUUAGAUACAGGAGCAGAU	10	AUCUGCUCUGUAUCUAAU	748
AUACAGGAGCAGAUAC	11	AUACAGGAGCAGAUAC	11	GUUAUCUGCUCUGUAU	749
GAGCAGAAGACAGUGGCA	12	GAGCAGAAGACAGUGGCA	12	UUGCCACUGUCUUCUGCUC	750
AGAGCAGAAGACAGUGGCA	13	AGAGCAGAAGACAGUGGCA	13	UGCCACUGUCUUCUGCUCU	751
GCAGAAGACAGUGGCAU	14	GCAGAAGACAGUGGCAU	14	CAUUGCCACUGUCUUCUGC	752
AGAUACAGGAGCAGAU	15	AGAUACAGGAGCAGAU	15	AUCAUCUGCUCUGUAUCU	753
UACAGGAGCAGAUACA	16	UACAGGAGCAGAUACA	16	UGUAUACUCUGCUCUGUA	754
UAUUAGAUACAGGAGCAG	17	UAUUAGAUACAGGAGCAG	17	UCUGCUCUGUAUCUAAUA	755
GAUACAGGAGCAGAUUA	18	GAUACAGGAGCAGAUUA	18	UAUCAUCUGCUCUGUAUC	756
AUGGAAACAGAUAGGAG	19	AUGGAAACAGAUAGGAG	19	CCUGCCACUGUCUUCUCCAU	757
GUCAACAUAAUUGGAAGAA	20	GUCAACAUAAUUGGAAGAA	20	UUUCUCCAAUUAUGUUGAC	758
UAUGGAAACAGAUAGGAG	21	UAUGGAAACAGAUAGGAG	21	CUGCCACUGUCUUCUCCAU	759
AUGAUAGGGGAAUUGGAG	22	AUGAUAGGGGAAUUGGAG	22	CUCCAAUCCCCCUUAUCA	760
CAGAAGACAGUGGCAUUA	23	CAGAAGACAGUGGCAUUA	23	UCAUUGCCACUGUCUUCUG	761
CAUUGGCCAUUGACAGAA	24	CAUUGGCCAUUGACAGAA	24	CUUCUGUCUAAUGGCCAUUG	762
UCAACAUAAUUGGAAGAAA	25	UCAACAUAAUUGGAAGAAA	25	UUUCUCCAAUUAUGUUGA	763
AAUGGCCAUUGACAGAA	26	AAUGGCCAUUGACAGAA	26	UCUUCUGUCAAUGGCCAUU	764
UGAUAGGGGAAUUGGAG	27	UGAUAGGGGAAUUGGAG	27	CCUCCAAUCCCCCUUAUCA	765
GACAGGCUAUUUUUAGG	28	GACAGGCUAUUUUUAGG	28	CCUAAAAAUUAGCCUGUC	766
AUUUCGGGUUUUUAACAG	29	AUUUCGGGUUUUUAACAG	29	CUGUAUAAACCCGAAAU	767
CUAUAGAUACAGGAGCAG	30	CUAUAGAUACAGGAGCAG	30	CUGCUCUGUAUCUAAUAG	768

40

30

20

10

AGACAGGCUAAUUUUUAG	31	AGACAGGCUAAUUUUUAG	31	CUAAAAAUUAGCCUGUCU	769
AAUAGAUAGGGGAAUUGG	32	AAUAGAUAGGGGAAUUGG	32	CCAAUUCGCCUUAUCAUUU	770
UAUUGGCAAGCAGGGAGCU	33	UAUUGGCAAGCAGGGAGCU	33	AGCUCUCCUGCUUGCCCAUA	771
UAGUAUUGGGCAAGCAGGGA	34	UAGUAUUGGGCAAGCAGGGA	34	UCCUGCUCUUGCCCAUACUA	772
GAAAACAGAUUGGCAGGUGA	35	GAAAACAGAUUGGCAGGUGA	35	UCACCUGCCAUUGUUUUC	773
ACCAUCAUAGAGGAAGCUG	36	ACCAUCAUAGAGGAAGCUG	36	CAGCUUCCUUAUGAUGGU	774
AAUAGAUAGGGGAAUUGGA	37	AAUAGAUAGGGGAAUUGGA	37	UCCAAUUCGCCUUAUCAUU	775
UGGAAACAGAUUGGCAGGU	38	UGGAAACAGAUUGGCAGGU	38	ACCUGCCAUUGUUUCCA	776
GGAAACAGAUUGGCAGGUG	39	GGAAACAGAUUGGCAGGUG	39	CACCUGCCAUUGUUUCC	777
GAUUAUGGAAACAGAUUG	40	GAUUAUGGAAACAGAUUG	40	CCAUCUGUUUCCAUAUAGC	778
AAAAGAUAGGGGAAUUG	41	AAAAGAUAGGGGAAUUG	41	CAAUUCCCCUUAUCAUUU	779
UGGAAAGGUAGAGGGGAG	42	UGGAAAGGUAGAGGGGAG	42	CUGCCCUUACGUUUCCA	780
AUCAUAGAGGAAGCUGAG	43	AUCAUAGAGGAAGCUGAG	43	CUGAGCUUCCUUAUGUA	781
UGGAAACCAAAAUAGUAG	44	UGGAAACCAAAAUAGUAG	44	CUAUAUUUUUGGUUUCCA	782
CCAUCAUAGAGGAAGCUGC	45	CCAUCAUAGAGGAAGCUGC	45	GCAGCUUCCUUAUUGAUGG	783
AGGGAUUAUGGAAACAGA	46	AGGGAUUAUGGAAACAGA	46	UCUGUUUUCCAUAUAGCCU	784
GGAAACCAAAAUAGUAGG	47	GGAAACCAAAAUAGUAGG	47	CCUAUCAUUUUUGGUUUCC	785
UAGGGGGAUUGGAGGUUU	48	UAGGGGGAUUGGAGGUUU	48	AAACGUCCAAUCCCCCUA	786
UACAGUGCAGGGGAAAGAA	49	UACAGUGCAGGGGAAAGAA	49	UUCUUUCCCGUCACUGUA	787
CUCUAUUAUAGAUACAGGAGC	50	CUCUAUUAUAGAUACAGGAGC	50	GCUCUUGUAUCUAAUAGAG	788
GGAUUAUGGAAACAGAUUG	51	GGAUUAUGGAAACAGAUUG	51	CAUCUGUUUCCAUAUAGC	789
CCAAAAUAGAUAGGGGGA	52	CCAAAAUAGAUAGGGGGA	52	UUCUCCCUUAUUAUUUGG	790
AUGGAAACCAAAAUAGUA	53	AUGGAAACCAAAAUAGUA	53	UAUCAUUUUUGGUUUCCA	791
CAGUGCAGGGGAAAGAAUA	54	CAGUGCAGGGGAAAGAAUA	54	UAUUCUUUCCCGUCACUG	792
ACAAUGGCCAUUGACAGAA	55	ACAAUGGCCAUUGACAGAA	55	UUCUGUCAUUGGCCAUUGU	793
CCAUGCAUUGGACAGUAGA	56	CCAUGCAUUGGACAGUAGA	56	UCUACUUGUCCAUGCAUGG	794
AUUUAUGGAAACAGAUUGG	57	AUUUAUGGAAACAGAUUGG	57	GCCAUCUGUUUCCAUAUAG	795
AACAAUGGCCAUUGACAGA	58	AACAAUGGCCAUUGACAGA	58	UCUGUCAUUGGCCAUUGUU	796
AAAAUAGAUAGGGGGAUUU	59	AAAAUAGAUAGGGGGAUUU	59	AAUUCUCCCUUAUUAUUU	797
GCCAUGCAUUGGACAGUAG	60	GCCAUGCAUUGGACAGUAG	60	CUACUUGUCCAUGCAUGGC	798
UAGCAGGAAGAUUGCCAGU	61	UAGCAGGAAGAUUGCCAGU	61	ACUGGCCAUUCCUGCUA	799
CAAAAAUAGAUAGGGGGAU	62	CAAAAAUAGAUAGGGGGAU	62	AUUCUCCCUUAUUAUUU	800
AAGAAUAGAUAGGAGCAUG	63	AAGAAUAGAUAGGAGCAUG	63	CAUGCUGUAUCAUUUCU	801
UCUAUUAGAUACAGGAGCA	64	UCUAUUAGAUACAGGAGCA	64	UGCUCUUGUAUCUAAUAGA	802
GCUCUAUUAGAUACAGGAG	65	GCUCUAUUAGAUACAGGAG	65	CUCCUGUAUCUAAUAGGC	803
CAGGCUAAUUUUUAGGGA	66	CAGGCUAAUUUUUAGGGA	66	UCCUAAAAAUUAGCCUG	804

40

30

20

10

AGGAGCAGAUGAUACAGUA	67	AGGAGCAGAUGAUACAGUA	67	UACUGUAUCAUCUGCUCCU	805
AAACAAGGCCAUUGACAG	68	AAACAAGGCCAUUGACAG	68	CUGUCAAGGCCAUUGUUU	806
CGGGUUUAUUAACAGGGACA	69	CGGGUUUAUUAACAGGGACA	69	UGUCCCUUGUAUAAACCCG	807
CAACAUAUUUGGAAGAAAU	70	CAACAUAUUUGGAAGAAAU	70	AUUUCUCCCAUUUAUGUUG	808
UCAUAUGGAAGCUGCAGA	71	UCAUAUGGAAGCUGCAGA	71	UCUGCAGCUUCCCAUUGA	809
GGAAAGGUGAAGGGGCGAGU	72	GGAAAGGUGAAGGGGCGAGU	72	ACUGCCCUUCCACCUUCC	810
UUUCGGGUUUUAUACAGGG	73	UUUCGGGUUUUAUACAGGG	73	CCCUGAAUAAACCCGAAA	811
UCGGGUUUUAUACAGGGAC	74	UCGGGUUUUAUACAGGGAC	74	GUCCCUUGUAUAAACCCGA	812
ACAGUGCAGGGGAAAGAAU	75	ACAGUGCAGGGGAAAGAAU	75	AUUCUUUCCCCUGCACUGU	813
AUGCAUGGACAAGUAGACU	76	AUGCAUGGACAAGUAGACU	76	AGUCUACUUGUCCAUUGCAU	814
AAGCCAUUGCAUGGACAAGU	77	AAGCCAUUGCAUGGACAAGU	77	ACUUUGUCCAUUGCAUGGU	815
AGCCAUUGCAUGGACAAGUA	78	AGCCAUUGCAUGGACAAGUA	78	UACUUGUCCAUUGCAUGGU	816
GCAUUAUCAGAAGGAGCCA	79	GCAUUAUCAGAAGGAGCCA	79	UGGCUCCUUCUGAUAAUGC	817
AAUUGGAGAAGUGAAUUAU	80	AAUUGGAGAAGUGAAUUAU	80	AUAUUAUCACUUCUCCAAU	818
AGAAAAAUCAGUAACAGU	81	AGAAAAAUCAGUAACAGU	81	ACUGUUAUCAGAUUUUUUCU	819
GAAGCCAUUGCAUGGACAAG	82	GAAGCCAUUGCAUGGACAAG	82	CUUGUCCAUUGCAUGGUU	820
ACAGGCUAAUUUUUAGGG	83	ACAGGCUAAUUUUUAGGG	83	CCCUAAAAAUUAGCCUGU	821
GAAGAAUUGAUAGCAGCAU	84	GAAGAAUUGAUAGCAGCAU	84	AUGCUGUACAUUUUUUCC	822
UUUCGGGUUUUAUACAGG	85	UUUCGGGUUUUAUACAGG	85	CCUGUAUAAACCCGAAA	823
ACCAAAAUUGAUAGGGGGA	86	ACCAAAAUUGAUAGGGGGA	86	UCCCCCUAUCAUUUUUGGU	824
GAAGUGACAUAGCAGGAAC	87	GAAGUGACAUAGCAGGAAC	87	GUUCCUGCUUAGUCACUUC	825
UUCGGGUUUUAUACAGGGA	88	UUCGGGUUUUAUACAGGGA	88	UCCUGUAUAAACCCGAAA	826
AUAGGGGGAUUUGGAGGUU	89	AUAGGGGGAUUUGGAGGUU	89	AACCUCCAAUUCUCCCUAU	827
AGAAGAAUUGAUAGCAGCA	90	AGAAGAAUUGAUAGCAGCA	90	UGCUGUACAUUUUUUUCU	828
AUUGGAGAAGUGAAUUAU	91	AUUGGAGAAGUGAAUUAU	91	UAUAUUAUCACUUCUCCAAU	829
GGAAGUGACAUAGCAGGAA	92	GGAAGUGACAUAGCAGGAA	92	UUCUGCUAUGUCACUUC	830
AGGCUAAUUUUUAGGGAA	93	AGGCUAAUUUUUAGGGAA	93	UUCCCUAAAAAUUAGCCU	831
UUAUGGAAACAGAUUGGCA	94	UUAUGGAAACAGAUUGGCA	94	UGCCAUUGCUUUUCCCAUA	832
GGGAUUAUGGAAACAGAU	95	GGGAUUAUGGAAACAGAU	95	AUCUGUUUCCCAUAUCC	833
UAGAAGAAUUGAUAGCAGC	96	UAGAAGAAUUGAUAGCAGC	96	GCUGUACAUUUUUUUCUA	834
AGCUCUAUUAAGAUACAGGA	97	AGCUCUAUUAAGAUACAGGA	97	UCCUGUAUCUAUUAAGAGC	835
GUUAGGGCAAGCAGGGAGC	98	GUUAGGGCAAGCAGGGAGC	98	GCUCCUGCUUUGCCCAUAC	836
CUUAGGCAUCUCCUAUGGC	99	CUUAGGCAUCUCCUAUGGC	99	GCCAUAGGAGAUGCCUAG	837
GCAGGAACUACUAGUACCC	100	GCAGGAACUACUAGUACCC	100	GGGUACUAGUAGUCCUGC	838
GGGGAAGUGACAUAGCAGG	101	GGGGAAGUGACAUAGCAGG	101	CCUGCUAUGUCACUCCCC	839
UACAAUCCCAAGUCAAG	102	UACAAUCCCAAGUCAAG	102	CUUGACUUUGGGGAUUGUA	840

UUCUUACAAUCCCAAAG	103	UUCUUACAAUCCCAAAG	103	CUUUGGGGAUUGUAGGGAA	841
AAGCUCUAUUAAGAUACAGG	104	AAGCUCUAUUAAGAUACAGG	104	CCUGUAUCUAUUAAGAGCUU	842
CCUAUGGCAGGAAGAGCG	105	CCUAUGGCAGGAAGAGCG	105	CGCUUCCUCCUGCCAUAGG	843
AGGGGAAGUGACAUAGCAG	106	AGGGGAAGUGACAUAGCAG	106	CGCUAUGUCACUUCUCCU	844
UCCUAUGGCAGGAAGAGCG	107	UCCUAUGGCAGGAAGAGCG	107	GCUCUUCUGGACUUAUGGU	845
CAGCAUUAUCAGAAGGAGC	108	CAGCAUUAUCAGAAGGAGC	108	GCUCUUCUGAUUAUGGUG	846
AUCUCCUAUUGGCAGGAAGA	109	AUCUCCUAUUGGCAGGAAGA	109	UCUUCUCCUGCCAUAGGAGU	847
AGCAGGAACUACUAGUACC	110	AGCAGGAACUACUAGUACC	110	GGUACUAGUAGUUCUCCUG	848
GAAACCAAAAUUGAUAGGG	111	GAAACCAAAAUUGAUAGGG	111	CCCUAUCAUUUUUGGUUUC	849
AAACCAAAAUUGAUAGGGG	112	AAACCAAAAUUGAUAGGGG	112	CCCUAUCAUUUUUGGUUU	850
CAGAAGGAGCCACCCACA	113	CAGAAGGAGCCACCCACA	113	UGUGGGGUGGCUCCUUCUG	851
UAGCAGGAACUACUAGUAC	114	UAGCAGGAACUACUAGUAC	114	GUACUAGUAGUUCUCCUG	852
UGCAUGGACAAGUAGACUG	115	UGCAUGGACAAGUAGACUG	115	CAGUCUACUUGUCCAUUGCA	853
UUAAGGCAUCUCCUAUGGCA	116	UUAAGGCAUCUCCUAUGGCA	116	UGCCAUAGGAGAUUGCCUAA	854
UAUGGCAGGAAGAGCGGA	117	UAUGGCAGGAAGAGCGGA	117	UCCGCUUCUCCUGCCCAUA	855
AUAGCAGGAACUACUAGUA	118	AUAGCAGGAACUACUAGUA	118	UACUAGUAGUUCUCCUUAU	856
UAGACAUUAUAGCAACAGA	119	UAGACAUUAUAGCAACAGA	119	UCUGUUGCUUAUUAUGUCUA	857
CAUUAUCAGAAGGAGCCAC	120	CAUUAUCAGAAGGAGCCAC	120	GUGGCUUCUCCUGAUUAUG	858
CUAUGGCAGGAAGAGCGG	121	CUAUGGCAGGAAGAGCGG	121	CCGCUUCUCCUGCCCAUAG	859
GAUAGGGGGAUUUGGAGGU	122	GAUAGGGGGAUUUGGAGGU	122	ACCUCCAAUCCUCCUUAUC	860
ACAUAUCCCAAAGUCAAGG	123	ACAUAUCCCAAAGUCAAGG	123	CCUUGACUUUGGGGAUUGU	861
AUUCUUACAAUCCCAA	124	AUUCUUACAAUCCCAA	124	UUUGGGGAUUGUAGGGAAU	862
AACCAAAAUUGAUAGGGGG	125	AACCAAAAUUGAUAGGGGG	125	CCCCUAUCAUUUUUGGUU	863
UCUCCUAUUGGCAGGAAGAA	126	UCUCCUAUUGGCAGGAAGAA	126	UUCUCCUGCCCAUAGGAGA	864
CAUGCAUGGACAAGUAGAC	127	CAUGCAUGGACAAGUAGAC	127	GUCAUUCUUGUCCAUUGAU	865
CCUGUGUACCCACAGACCC	128	CCUGUGUACCCACAGACCC	128	GGGUCUGUGGGUACACAGG	866
CAUCAUUGAGGAAGCUGCA	129	CAUCAUUGAGGAAGCUGCA	129	UGCAGCUUCCUCCAUUGAU	867
GACAUAGCAGGAACUACUA	130	GACAUAGCAGGAACUACUA	130	UAGUAGUUCUCCUGCUAUG	868
GAAAGGUGAAGGGGCGAGUA	131	GAAAGGUGAAGGGGCGAGUA	131	UACUGCCCUUCCACCUUUC	869
AGUGACAUAGCAGGAACUA	132	AGUGACAUAGCAGGAACUA	132	UAGUUCUCCUGCUAUGACU	870
CGAGAUUAUACAGUAUUAU	133	CGAGAUUAUACAGUAUUAU	133	CUAAUACUGUAUACUCCUG	871
GGAGCAGAUUAUACAGUAU	134	GGAGCAGAUUAUACAGUAU	134	AUACUGUAUACUUCGUCC	872
CCAAGGGGAAGUGACAUAG	135	CCAAGGGGAAGUGACAUAG	135	CUAUGUCACUUCUCCUUGG	873
GAAGCUCUAUUAAGAUACAG	136	GAAGCUCUAUUAAGAUACAG	136	CUGUAUCUAAUAGAGCUUC	874
GGGAAGUGACAUAGCAGGA	137	GGGAAGUGACAUAGCAGGA	137	UCCUGCUAUGUCACUCC	875
CAUGCCUGUGUACCCACAG	138	CAUGCCUGUGUACCCACAG	138	CUGUGGGUACACAGGCAUG	876

GAAAGAGCAGAAGACAGUG	139	GAAAGAGCAGAAGACAGUG	139	CACUGUCUUCUGCUCUUC	877
ACAUAGCAGGAACUACUAG	140	ACAUAGCAGGAACUACUAG	140	CUAGUAGUUCUGCUAUGU	878
CAUCUCCUAGGCGAGGAAG	141	CAUCUCCUAGGCGAGGAAG	141	CUUCCUGCCUAGGAGAUU	879
GAGCAGAUAGUACAGUAUU	142	GAGCAGAUAGUACAGUAUU	142	AAUACUGUUAUACUUGCUC	880
AGCAUUAUCAGAAGGAGCC	143	AGCAUUAUCAGAAGGAGCC	143	GGCUCUUCUGUAUUGCU	881
CACCAGGCCAGAUAGAGA	144	CACCAGGCCAGAUAGAGA	144	UCUCUACUUGGCCUGGUG	882
GUGACAUAGCAGGAACUAC	145	GUGACAUAGCAGGAACUAC	145	GUAGUUCUGCUAUGUCAC	883
AGCAGGAAGAUUGCCAGUA	146	AGCAGGAAGAUUGCCAGUA	146	UACUGGCCAUUCUCCUGCU	884
GAGAACCAAGGGGAAGUGA	147	GAGAACCAAGGGGAAGUGA	147	UCACUCCCCUUGGUUCUC	885
AGUAGUGGCAAGCAGGGAG	148	AGUAGUGGCAAGCAGGGAG	148	CUCCUUGCUUGCCCAUACU	886
CCUACAAUCCCCAAAGUCA	149	CCUACAAUCCCCAAAGUCA	149	UGACUUGGGGAUUGUAGG	887
CUACAAUCCCCAAAGUCA	150	CUACAAUCCCCAAAGUCA	150	UUGACUUUGGGGAUUGUAG	888
GCCUGUGUACCCACAGACC	151	GCCUGUGUACCCACAGACC	151	GGUCUGUGGGUACACAGGC	889
AGCAGAUAGUACAGUAUU	152	AGCAGAUAGUACAGUAUU	152	UAAUACUGUUAUACUUGC	890
AGAGAACCAAGGGGAAGUG	153	AGAGAACCAAGGGGAAGUG	153	CACUUCGCCUUGGUUCUCU	891
CCCUACAAUCCCCAAAGUC	154	CCCUACAAUCCCCAAAGUC	154	GACUUUGGGGAUUGUAGGG	892
UGACAUAGCAGGAACUACU	155	UGACAUAGCAGGAACUACU	155	AGUAGUUCUGCUAUGUCA	893
UUUACAGAAGGAGCCACCC	156	UUUACAGAAGGAGCCACCC	156	GGUGUGCCUCCUUCGUAUA	894
AAGUGACAUAGCAGGAACU	157	AAGUGACAUAGCAGGAACU	157	AGUUCUGCUAUGUCACUU	895
GCAGGAAGAUUGCCAGUAA	158	GCAGGAAGAUUGCCAGUAA	158	UUACUGGCCAUUCUCCUGC	896
UAGGCAUCUCCUAGGCGAG	159	UAGGCAUCUCCUAGGCGAG	159	CUGCCAUAGGAGAUGCCUA	897
CAAGGGGAAGUGACAUAGC	160	CAAGGGGAAGUGACAUAGC	160	GCUAUGUCACUUCGCCUUG	898
AAAGAGCAGAAGACAGUGG	161	AAAGAGCAGAAGACAGUGG	161	CCACUGUCUUCUGCUCUUU	899
CUCUUAUGGCGAGGAAGAG	162	CUCUUAUGGCGAGGAAGAG	162	CUUCUUCUGCCAUAGGAG	900
UAUCAGAAGGAGCCACCCC	163	UAUCAGAAGGAGCCACCCC	163	GGGGUGGCUCCUUCUGUAU	901
AUUUAUCAGAAGGAGCCACC	164	AUUUAUCAGAAGGAGCCACC	164	GGUGGCUCCUUCUGUAUUA	902
AUGCCUGUGUACCCACAGA	165	AUGCCUGUGUACCCACAGA	165	UCUGUGGGUACACAGGCAU	903
AAUUAUGUAGAUUUCAGAG	166	AAUUAUGUAGAUUUCAGAG	166	CUCUGAAAUACUAAUUAU	904
UGCAUUAAGCAGCUGCUU	167	UGCAUUAAGCAGCUGCUU	167	AAGCAGCUGCUUUAUGCA	905
AAUUAUGUAGAUUUCAGAGA	168	AAUUAUGUAGAUUUCAGAGA	168	UCUCUGAAAUACUAAUUA	906
GCAUCUCCUAGGCGAGGAA	169	GCAUCUCCUAGGCGAGGAA	169	UUCUGGCCAUAGGAUGUC	907
AGAACCAAGGGGAAGUGAC	170	AGAACCAAGGGGAAGUGAC	170	GUCACUUCGCCUUGGUUCU	908
UCAAAAUUUUCGGGUUUUAU	171	UCAAAAUUUUCGGGUUUUAU	171	AUAAACCGAAAAUUUGA	909
CAGGGAUGGAAAGGAUAC	172	CAGGGAUGGAAAGGAUAC	172	GUGAUCCUUCUCCUCCUUC	910
GAAGGAGCCACCCACAAG	173	GAAGGAGCCACCCACAAG	173	CUUGUGGGGUGGCCUUCU	911
AAUUUCGGGUUUUAUACA	174	AAUUUCGGGUUUUAUACA	174	UGUAAUAAACCGAAAAUU	912

AGCAGGAAGCACUAGGGC	175	AGCAGGAAGCACUAGGGC	175	GCCCAUAGUGCUUCCUGCU	913
AUCAGAAGGAGCCACCCCA	176	AUCAGAAGGAGCCACCCCA	176	UGGGGUGGCUCCUUCUGAU	914
UGAGAGAACCAAGGGGAAG	177	UGAGAGAACCAAGGGGAAG	177	CUUCGCCUUGGUUCUCUA	915
AAGGUGAAGGGGCAGUAGU	178	AAGGUGAAGGGGCAGUAGU	178	ACUACUGCCCUUCCACCUU	916
GAAAAAUACAGUAACAGUA	179	GAAAAAUACAGUAACAGUA	179	UACUGUUAUGAUUUUUCU	917
CAUUGAGGAAGCUGCAGAA	180	CAUUGAGGAAGCUGCAGAA	180	UUCUGCAGCUUCCUUAUG	918
AGAUGAUACAGUAUUAGAA	181	AGAUGAUACAGUAUUAGAA	181	UUCUAAUACUGUAUCAUCU	919
UGAGGAAGCUGCAGAAUGG	182	UGAGGAAGCUGCAGAAUGG	182	CCAUUCUGCAGCUUCCUCA	920
UAUUUAUGACCCAUCAAAG	183	UAUUUAUGACCCAUCAAAG	183	CUUUUAUGGGGUAUUAUA	921
UCACUCUUUGGCAACGACC	184	UCACUCUUUGGCAACGACC	184	GGUCGUUGCCAAAGAGUGA	922
UGGAGAAAAUUAUAGAUU	185	UGGAGAAAAUUAUAGAUU	185	AAUCUACUAAUUAUUCUCCA	923
AGACAGGAUGAGGAUUAGA	186	AGACAGGAUGAGGAUUAGA	186	UCUAAUCCUACUCCUGUCU	924
AAAGGUGAAGGGGCAGUAG	187	AAAGGUGAAGGGGCAGUAG	187	CUACUGCCCUUCCACCUUU	925
GGCAUCUCCUAGGCGAGGA	188	GGCAUCUCCUAGGCGAGGA	188	UCCUGCCAUAGGAGAUGCC	926
AAGGAGCCACCCACAAGA	189	AAGGAGCCACCCACAAGA	189	UCUUGUGGGGUGGCUCCUU	927
UAAAGCCAGGAUUGGAUGG	190	UAAAGCCAGGAUUGGAUGG	190	CCAUCCAUUCCUGGCUUUA	928
GGAGAAAAUUAUAGAUUU	191	GGAGAAAAUUAUAGAUUU	191	AAAUACUAAUUAUUCUCC	929
AAGAGCAGAAGACAGUGGC	192	AAGAGCAGAAGACAGUGGC	192	GCCACUGUCUUCUGCUCUU	930
UCAGAAGGAGCCACCCAC	193	UCAGAAGGAGCCACCCAC	193	GUUGGGUGGCUCCUUCUGA	931
AGGCAUCUCCUAGGCGAGG	194	AGGCAUCUCCUAGGCGAGG	194	CCUGCCAUAGGAGAUGCCU	932
AGGGAUGGAAGGAUACCC	195	AGGGAUGGAAGGAUACCC	195	GGUGAUCCUUAUCCAUCCU	933
AGGAAGCUGCAGAAUGGGA	196	AGGAAGCUGCAGAAUGGGA	196	UCCCAUUCUGCAGCUUCCU	934
CUGCAUUAUAGCAGCUGCU	197	CUGCAUUAUAGCAGCUGCU	197	AGCAGCUGCUUAUUAUGCAG	935
AAGGGGCAGUAGUAUACA	198	AAGGGGCAGUAGUAUACA	198	UGUAAUUAUACUGCCCCUU	936
UUGACUAGCGGAGGCUAGA	199	UUGACUAGCGGAGGCUAGA	199	UCUAGCCUCCGCUAGUCAA	937
UAAAAGACACCAAGGAAGC	200	UAAAAGACACCAAGGAAGC	200	GCUUCCUUGGUGUCCUUUA	938
GAGGAAGCUGCAGAAUGGG	201	GAGGAAGCUGCAGAAUGGG	201	CCCAUUCUGCAGCUUCCUC	939
CAGCAGGAAGCACUAGUGG	202	CAGCAGGAAGCACUAGUGG	202	CCCAUAGUGCUUCCUGCUG	940
GGAGCCACCCACAAGAUU	203	GGAGCCACCCACAAGAUU	203	AAUCUUUGGGGUGGCCUCC	941
AUUUAUGACCCAUCAAAGA	204	AUUUAUGACCCAUCAAAGA	204	UCUUUUUGAUGGGUCAAUAU	942
CAGAUGAUACAGUAUUAGA	205	CAGAUGAUACAGUAUUAGA	205	UCUAAUACUGUAUACUUG	943
AUGAGAGAACCAAGGGGA	206	AUGAGAGAACCAAGGGGA	206	UUCCCCUUGGUUCUCUUAU	944
AUGAGGAAGCUGCAGAAUG	207	AUGAGGAAGCUGCAGAAUG	207	CAUUCUGCAGCUUCCUCAU	945
UGCCUGUGUACCCACAGAC	208	UGCCUGUGUACCCACAGAC	208	GUUCUGUGGUACACAGGCA	946
GAAGGGGCAGUAGUAUAC	209	GAAGGGGCAGUAGUAUAC	209	GUAAUACUACUGGCCUUC	947
UCAGCAUUAUCAGAAGGAG	210	UCAGCAUUAUCAGAAGGAG	210	CUCUUCUGUAUUAUGCUGA	948

UUCAAAAUUUCGGGUUUA	211	UUCAAAAUUUCGGGUUUA	211	UAAACCCGAAAAUUUGAA	949
UCUGGAAAGGUGAAGGGGC	212	UCUGGAAAGGUGAAGGGGC	212	GCCCCUUCACCUUCCAGA	950
UUAGCAGGAAGAUAGGCCAG	213	UUAGCAGGAAGAUAGGCCAG	213	CUGGCCAUUCCUGCUAA	951
GAACCAAGGGGAAGUGACA	214	GAACCAAGGGGAAGUGACA	214	UGUCACUUCUCCUGGUUC	952
AGAAGGAGCCACCCACAA	215	AGAAGGAGCCACCCACAA	215	UUGUGGGUGGCUCCUUCU	953
AAUGAGGAAGCUGCAGAAU	216	AAUGAGGAAGCUGCAGAAU	216	AUUCUGCAGCUCCUUAU	954
AAGAAAAAUCAGUACAG	217	AAGAAAAAUCAGUACAG	217	CUGUACUGAUUUUUUUCU	955
GGAAUUGGAGGUUUUAUCA	218	GGAAUUGGAGGUUUUAUCA	218	UGAUAAAACCUCAAUUC	956
UACAGUAUUAGUAGGACCU	219	UACAGUAUUAGUAGGACCU	219	AGGUCCUACUAAUACUGUA	957
CCAGGAUUGGAGGCCCAA	220	CCAGGAUUGGAGGCCCAA	220	UUGGGCCAUCCAUUCCUGG	958
UUCUAGUAGAUUGGGGCG	221	UUCUAGUAGAUUGGGGCG	221	CUGCCCCAUCAUAAGAA	959
CAAAUUUUUCGGGUUUUAU	222	CAAAUUUUUCGGGUUUUAU	222	AAUAAACCCGAAAAUUUG	960
UAGACAGGAUGAGGAUUAG	223	UAGACAGGAUGAGGAUUAG	223	CUAAUCCUACUCCUGUCUA	961
UGACAGAAGAAAAAUAAA	224	UGACAGAAGAAAAAUAAA	224	UUUAUUUUUUCUUCUGUA	962
UUUAUUACAGGGACAGCAG	225	UUUAUUACAGGGACAGCAG	225	CUGCUGUCCUGUAUAAA	963
GGGUUUUUACAGGGGACAG	226	GGGUUUUUACAGGGGACAG	226	CUGUCCUGUAUAAACCC	964
AGAUGGAACAAGGCCAGA	227	AGAUGGAACAAGGCCAGA	227	UCUGGGCGUUGUCCAUUCU	965
CUAGCGGAGGCUAGAAGGA	228	CUAGCGGAGGCUAGAAGGA	228	UCCUUCUAGCCUCCGCUAG	966
UGACUAGCGGAGGCUAGAA	229	UGACUAGCGGAGGCUAGAA	229	UUCUAGCCUCCGCUAGUA	967
GACAUAAUAGCAACAGACA	230	GACAUAAUAGCAACAGACA	230	UGUCUGUGCUAUUUGUC	968
GGUUUUUUACAGGGACAGC	231	GGUUUUUUACAGGGACAGC	231	GCUGUCCUGUAUAAACC	969
GCAGGUGAUUUGUGUGG	232	GCAGGUGAUUUGUGUGG	232	CCACACAUCUACCCUGC	970
AUGGCAGGAAGAAGCGGAG	233	AUGGCAGGAAGAAGCGGAG	233	CUCCGCUUCUCCUGCCAU	971
AGGUGAUUUGUGUGGCA	234	AGGUGAUUUGUGUGGCA	234	UGCCACACAUAUACCCU	972
CCACCCCAAGAUUUAAA	235	CCACCCCAAGAUUUAAA	235	UUUAAAUUUGUGGGGUGG	973
GUAAAAAUUGGAGACAG	236	GUAAAAAUUGGAGACAG	236	CUGUCAUCCAAUUUUUAC	974
AUAAUAGCAACAGACAUAC	237	AUAAUAGCAACAGACAUAC	237	GUUUGUCUGUUGCUAUUAU	975
GCAUUAAGCAGCUGCUUU	238	GCAUUAAGCAGCUGCUUU	238	AAAGCAGCUGCUUUAUUGC	976
GGCAGGUGAUUUGUGUG	239	GGCAGGUGAUUUGUGUG	239	CACACAUCUACCCUGCC	977
AUGAUACAGAUUAGGAAGA	240	AUGAUACAGAUUAGGAAGA	240	UCUUCUAAUACUGUAUUA	978
GAUGGCAGGUGAUUUGU	241	GAUGGCAGGUGAUUUGU	241	ACAAUACUACCCUGCCAU	979
CAUAAUAGCAACAGACAU	242	CAUAAUAGCAACAGACAU	242	UAUGUCUGUUGCUUUAUUG	980
AAAAUUUUUCGGGUUUUAU	243	AAAAUUUUUCGGGUUUUAU	243	UAAUAAACCCGAAAAUUU	981
ACAUAAUAGCAACAGACAU	244	ACAUAAUAGCAACAGACAU	244	AUGUCUGUUGCUUUAUUG	982
AUUUCAAAAAUUGGGCCUG	245	AUUUCAAAAAUUGGGCCUG	245	CAGGCCCAAUUUUGAAAU	983
CUGGAAAGGUGAAGGGGCA	246	CUGGAAAGGUGAAGGGGCA	246	UGCCCCUUCACCUUCCAG	984

AAAACAGAUAGGAGGUGAU	247	AAAACAGAUAGGAGGUGAU	247	AUCACCUCCAUUCUGUUUU	985
UUUCAAAAAUUGGGCCUGA	248	UUUCAAAAAUUGGGCCUGA	248	UCAGGCCCAAUUUUUGAAA	986
GAGAGAACAAGGGGAAGU	249	GAGAGAACAAGGGGAAGU	249	ACUUCUCCUUGGUUUCUCUC	987
CUCUGGAAAGGUAGAGGGG	250	CUCUGGAAAGGUAGAGGGG	250	CCCUUCACCUUUCAGAG	988
AUUAGCAGGAAGAUUGCCA	251	AUUAGCAGGAAGAUUGCCA	251	UGGCCAUUCCUGCUAAU	989
GAGCCACCCCAAGAUUUU	252	GAGCCACCCCAAGAUUUU	252	AAAUUCUUGUGGGUGGUCUC	990
CAUAGCAGGAACUACUAGU	253	CAUAGCAGGAACUACUAGU	253	ACUAGUAGUCCUGCUUAG	991
UUUUAAAAGAAAAGGGGGG	254	UUUUAAAAGAAAAGGGGGG	254	CCCCCUUUUUCUUUAAAA	992
GCGGAGGCUAGAAGGAGAG	255	GCGGAGGCUAGAAGGAGAG	255	CUCUCUUCUAGCCUCCGC	993
CAGUAUUAGUAGGACCUAC	256	CAGUAUUAGUAGGACCUAC	256	GUAGGUCCUACUAAUACUG	994
AGGGGGAAUUGGAGGUUUU	257	AGGGGGAAUUGGAGGUUUU	257	AAAACCUCCAUUCCCCCU	995
ACAGUAUUAGUAGGACCUA	258	ACAGUAUUAGUAGGACCUA	258	UAGGUCCUACUAAUACUGU	996
GACUAGCGGAGGCUAGAAG	259	GACUAGCGGAGGCUAGAAG	259	CUUCUAGCCUCCGCUAGUC	997
GUUUUUUACAGGGACAGCA	260	GUUUUUUACAGGGACAGCA	260	UGUCUCCUUGUAUAAAC	998
CAGGUGAUUUGUGUGGC	261	CAGGUGAUUUGUGUGGC	261	GCCACACAUCUACCCUG	999
AGCGGAGGCUAGAAGGAGA	262	AGCGGAGGCUAGAAGGAGA	262	UCUCCUUCUAGCCUCCGCU	1000
UCUAGUAGAUUGGGGACGC	263	UCUAGUAGAUUGGGGACGC	263	GCUGGCCCAUCUACAUAGA	1001
UAAAAAUUGGAGUACAGA	264	UAAAAAUUGGAGUACAGA	264	UCUGUCAUCCAUUUUUUA	1002
GCAGCAGGAAGCACUAUGG	265	GCAGCAGGAAGCACUAUGG	265	CCAUAGUGCUUCCUGGUCG	1003
UUUUUACAGGGACAGCAGA	266	UUUUUACAGGGACAGCAGA	266	UCUGUGUCCUGUAUAA	1004
AAACAGAUAGGAGGUGAUG	267	AAACAGAUAGGAGGUGAUG	267	CAUCACCUGCCAUUCUGUUU	1005
AUUCAAAAUUUCGGGUUUU	268	AUUCAAAAUUUCGGGUUUU	268	AAACCCGAAAAUUUGAAU	1006
GGGGAUUUGGAGGUUUUAU	269	GGGGAUUUGGAGGUUUUAU	269	AUAAACCCUCCAAUCCCC	1007
GCCACCCCAAGAUUUUA	270	GCCACCCCAAGAUUUUA	270	UUAAAUUCUUGUGGGUGGC	1008
GAUGAUACAGUUAUAGAAG	271	GAUGAUACAGUUAUAGAAG	271	CUUCUAAUACUGUAUAC	1009
UAUAGCAACAGACAUACA	272	UAUAGCAACAGACAUACA	272	UGUAUGUCUGUUGCUAUUA	1010
GAGGCUAGAAGGAGAGAGA	273	GAGGCUAGAAGGAGAGAGA	273	UCUCUCUCCUUCUAGCCUC	1011
GUACAGUUAUAGUAGGACC	274	GUACAGUUAUAGUAGGACC	274	GGUCCUACUAAUACUGUAC	1012
UAGCGGAGGCUAGAAGGAG	275	UAGCGGAGGCUAGAAGGAG	275	CUCCUUCUAGCCUCCGCUA	1013
CGGAGGCUAGAAGGAGAGA	276	CGGAGGCUAGAAGGAGAGA	276	UCUCUCCUUCUAGCCUCCG	1014
GGUACAGUUAUAGUAGGAC	277	GGUACAGUUAUAGUAGGAC	277	GUCCUACUAAUACUGUACC	1015
AAUUUUUCGGGUUUUAUAC	278	AAUUUUUCGGGUUUUAUAC	278	GUAAUAAACCCGAAAAUUU	1016
AGCAGCAGGAAGCACUAUG	279	AGCAGCAGGAAGCACUAUG	279	CAUAGUGCUUCCUGGUCU	1017
AGCCACCCCAAGAUUUUA	280	AGCCACCCCAAGAUUUUA	280	UAAAUUCUUGUGGGUGGCU	1018
AACCAAGGGGAAGUGACAU	281	AACCAAGGGGAAGUGACAU	281	AUGUCACUCCUCCUUGGUU	1019
AAGGGGAAGUGACAUAGCA	282	AAGGGGAAGUGACAUAGCA	282	UGCUAUGUCACUUCUCCGU	1020

UUAAGCCAGGAUUGGAUG	283	UUAAGCCAGGAUUGGAUG	283	CAUCCAUUCCUGGCUUUA	1021
ACUAGCGGAGGCUAGAAGG	284	ACUAGCGGAGGCUAGAAGG	284	CCUUCUAGCCUCGCUAGU	1022
UAGGUACAGUUAUUGUAGG	285	UAGGUACAGUUAUUGUAGG	285	CCUACUAAUACUGUACCUA	1023
GGGGGAUUUGGAGGUUUUA	286	GGGGGAUUUGGAGGUUUUA	286	UAAAACCUCCAAUUCGCC	1024
AGAUGGCAGGUGAUUGAUUG	287	AGAUGGCAGGUGAUUGAUUG	287	CAAUCAUACCCUGCCAUUCU	1025
UUAACCAUUGGCCAUUGAC	288	UUAACCAUUGGCCAUUGAC	288	GUCAUUGGCCAUUUGUUUA	1026
UGGCAGGUGAUUGUGUGU	289	UGGCAGGUGAUUGUGUGU	289	ACACAAUACUACCCUGCCA	1027
UAAAAUAGCAGGAAGAUG	290	UAAAAUAGCAGGAAGAUG	290	CAUCUCCUGCUAAUUUA	1028
AGGAGCCACCCACAGAAGU	291	AGGAGCCACCCACAGAAGU	291	AUCUUGUGGGUGGCUCCU	1029
GUUUUAGUAGGACCUACAC	292	GUUUUAGUAGGACCUACAC	292	GUUAGGUCCUACUAAUAC	1030
AAUCCCCAAAGUCAAGGAG	293	AAUCCCCAAAGUCAAGGAG	293	CUCUUGACUUUGGGGAGU	1031
CCAGGCCAGAUAGAGAGAAC	294	CCAGGCCAGAUAGAGAGAAC	294	GUUCUCUACUUGGCCUGG	1032
CCAUUGACAGAGAAAAA	295	CCAUUGACAGAGAAAAA	295	UUUUUUUUUUCUGUCAAUGG	1033
CAGAUUGCAGGUGAUUAU	296	CAGAUUGCAGGUGAUUAU	296	AAUCAUACCCUGCCAUUCG	1034
CAGAUAGAGAACCAAGGG	297	CAGAUAGAGAACCAAGGG	297	CCUUGGUUUCUCUACUUG	1035
GCCAUUGACAGAGAAAAA	298	GCCAUUGACAGAGAAAAA	298	UUUUUUUUUUCUGUCAAUGG	1036
UAUUAGUAGGACCUACACC	299	UAUUAGUAGGACCUACACC	299	GGUGUAGGUCCUACUAAUA	1037
UCUCGACGCGAGGACUGGC	300	UCUCGACGCGAGGACUGGC	300	GCCGAGUCCUGCGUCGAGA	1038
AGAUGAGAGAACCAAGGGG	301	AGAUGAGAGAACCAAGGGG	301	CCCCUUGGUUUCUCUACU	1039
AUCCCCAAAGUCAAGGAGU	302	AUCCCCAAAGUCAAGGAGU	302	ACUCCUUGACUUUGGGGAGU	1040
AAUUAGCAGGAAGAUGGCC	303	AAUUAGCAGGAAGAUGGCC	303	GGCCAUUCUCCUGCUAAUU	1041
GGGAUUUGGAGGUUUUAUC	304	GGGAUUUGGAGGUUUUAUC	304	GAUAAAACCUCCAAUUC	1042
CUCGACGCGAGGACUGGCU	305	CUCGACGCGAGGACUGGCU	305	AGCCGAGUCCUGCGUCGAG	1043
AUGGCCAUUGACAGAGAA	306	AUGGCCAUUGACAGAGAA	306	UUCUUCUGUCAAUGGCCAU	1044
AAAAUAGCAGGAAGAUGG	307	AAAAUAGCAGGAAGAUGG	307	CCAUCUCCUGCUAAUUUU	1045
ACGCGAGGACUGGCUUGCU	308	ACGCGAGGACUGGCUUGCU	308	AGCAAGCCGAGUCCUGCGU	1046
UAAACAUGGCCAUUGACA	309	UAAACAUGGCCAUUGACA	309	UGUCAAUGGCCAUUUGUUUA	1047
GAUGGAACAAGCCCCAGAA	310	GAUGGAACAAGCCCCAGAA	310	UUCUGGGGCUUGGUUCCAU	1048
AAUGAACAGUAGAUAAU	311	AAUGAACAGUAGAUAAU	311	AUUUAUCUACUUGUUAU	1049
AUUGGAGGUUUUAUCAAAG	312	AUUGGAGGUUUUAUCAAAG	312	CUUUUAUAAAACCUCCAAU	1050
AGGCUAGAAGGAGAGAGAU	313	AGGCUAGAAGGAGAGAGAU	313	AUCUCUCUCCUUCUAGCCU	1051
AGAUGGGUGCGAGAGCGUC	314	AGAUGGGUGCGAGAGCGUC	314	GACGCUUCGCGACCCAUUCU	1052
AGGUACAGUUAUAGUAGGA	315	AGGUACAGUUAUAGUAGGA	315	UCCUACUAAUACUGUACCU	1053
GGAGGCUAGAAGGAGAGAG	316	GGAGGCUAGAAGGAGAGAG	316	CUCUCUCCUUCUAGCCUCC	1054
CAGGACAUAAACAGGUAGG	317	CAGGACAUAAACAGGUAGG	317	CCUACCUUGUUUAGUCCUG	1055
AGUUAUAGUAGGACCUACA	318	AGUUAUAGUAGGACCUACA	318	UGUAGGUCCUACUAAUACU	1056

UUGACAGAGAAAAAUAA	319	UUGACAGAGAAAAAUAA	319	UUUUUUUUUUCUUCUGCAA	1057
UGGAGAAUGUAAUUAUUA	320	UGGAGAAUGUAAUUAUUA	320	UAUUAUUAUUCACUUCUCA	1058
CUCUCGACGCGAGGACUGCG	321	CUCUCGACGCGAGGACUGCG	321	CGGAGUCCUGCGUCGAGAG	1059
AUGAACAGUAGAUAAUU	322	AUGAACAGUAGAUAAUU	322	AAUUUAUUAUACUUGUUAU	1060
UGGCCAUUGACAGAGAAA	323	UGGCCAUUGACAGAGAAA	323	UUUCUUCUGUCAUUGGCCA	1061
AUACCCAUUGUUUUCAGCAU	324	AUACCCAUUGUUUUCAGCAU	324	AUGCUGAAAACUUGGUUAU	1062
UUUAAAAGAAAAGGGGGA	325	UUUAAAAGAAAAGGGGGA	325	UCCCCUUUUUUUUUUAAA	1063
CGACGCGAGGACUGGCUUG	326	CGACGCGAGGACUGGCUUG	326	CAAGCCGAGUCCUGCGUCG	1064
AUUGACAGAGAAAAAUUA	327	AUUGACAGAGAAAAAUUA	327	UAUUUUUUUUCUUCUGCAAU	1065
CUAGAAGGAGAGAGAUUGG	328	CUAGAAGGAGAGAGAUUGG	328	CCCAUCUCUCCUUCUUAU	1066
UGGCAGGAAGAAGCGGAGA	329	UGGCAGGAAGAAGCGGAGA	329	UCUCCGCUUCUUCUGCCA	1067
CAAUCCCCAAAGUCAAGGA	330	CAAUCCCCAAAGUCAAGGA	330	UCCUUGACUUUGGGGAUUG	1068
AAAUUCAAUUUUUCGGGU	331	AAAUUCAAUUUUUCGGGU	331	ACCCGAAAAUUUUGAAUUU	1069
GAUUUGGAGGUUUUAUCAA	332	GAUUUGGAGGUUUUAUCAA	332	UUGAUAAAACCUCCAAUUC	1070
GACGCGAGGACUGGCUUGC	333	GACGCGAGGACUGGCUUGC	333	GCAAGCCGAGUCCUGCGUC	1071
UUUGACUAGCGGAGGCUAG	334	UUUGACUAGCGGAGGCUAG	334	CUAGCCUCCGCUAGUCAA	1072
AUAGGUACAGUUAUUGUAG	335	AUAGGUACAGUUAUUGUAG	335	CUACUAAUACUUGUACCUAU	1073
GGCUAGAAGGAGAGAGAU	336	GGCUAGAAGGAGAGAGAU	336	CAUCUCUCUCCUUCUAGCC	1074
ACCAGGCCAGAUAGAGAGAA	337	ACCAGGCCAGAUAGAGAGAA	337	UUCUCUACUCUGGCCUGGU	1075
GAUGAGAGAACCAAGGGGA	338	GAUGAGAGAACCAAGGGGA	338	UCCCUUUGGUUCUCUACUC	1076
GGAGCAGCAGGAAGCACUA	339	GGAGCAGCAGGAAGCACUA	339	UAGUGCUUCCUGCGUCCU	1077
UCUCUCGACGCGAGGACUCG	340	UCUCUCGACGCGAGGACUCG	340	CGAGUCCUGCGUCGAGAGA	1078
UCCUACAAUCCCAAAGU	341	UCCUACAAUCCCAAAGU	341	ACUUUGGGGAUUGUAGGGA	1079
UUGGAGGUUUUAUCAAAGU	342	UUGGAGGUUUUAUCAAAGU	342	ACUUUUUAUAAAACCUCCAA	1080
ACUGUACCAUAAAAUUA	343	ACUGUACCAUAAAAUUA	343	UUAAUUUUUACUGGUACAGU	1081
AUGGCAGGUGAUUAUGUG	344	AUGGCAGGUGAUUAUGUG	344	CACAUCUACACCUGCCAU	1082
GAGGAAUUGAACAGUAGA	345	GAGGAAUUGAACAGUAGA	345	UCUACUUGUUAUUAUUCUC	1083
AGACAUAAUAGCAACAGAC	346	AGACAUAAUAGCAACAGAC	346	GUCUGUUGCUUAUUAUGUCU	1084
AAAUUAGCAGGAAGAUGGC	347	AAAUUAGCAGGAAGAUGGC	347	GCCAUUCCUUGCUAAUUU	1085
UUUGGAGAAGUAAUUAU	348	UUUGGAGAAGUAAUUAU	348	AUAUAAUUAUACUUCUCAA	1086
UCGACGCGAGGACUGGCUU	349	UCGACGCGAGGACUGGCUU	349	AAGCCGAGUCCUGCGUCGA	1087
AAAAUUCAAAAUUUUCGGG	350	AAAAUUCAAAAUUUUCGGG	350	CCCGAAAAUUUUGAAUUU	1088
CAGGCCAGAUAGAGAAACC	351	CAGGCCAGAUAGAGAAACC	351	GGUUUCUCUACUUGGCCUG	1089
UACCCAUUUUUCAGCAUU	352	UACCCAUUUUUCAGCAUU	352	AAUGCUGAAAAUUGGGUA	1090
ACACAUGCCUGUGUACCCA	353	ACACAUGCCUGUGUACCCA	353	UGGUACACAGGCAUGUGU	1091
GGCCAUUGACAGAGAAAA	354	GGCCAUUGACAGAGAAAA	354	UUUUUUUUCUGUCAAUGGCC	1092

GAGCAGCAGGAAGCACUAU	355	GAGCAGCAGGAAGCACUAU	355	AUAGUGCUUCCUGCUGCUC	1093
CUGUACCCAGUAAAUAUAA	356	CUGUACCCAGUAAAUAUAA	356	UUUAAUUUACUGGUACAG	1094
GAAAUUGAUGACAGCAUGUC	357	GAAAUUGAUGACAGCAUGUC	357	GACAUUGCUGCAUCAUUC	1095
CAUUGACAGAAGAAAAAU	358	CAUUGACAGAAGAAAAAU	358	AUUUUUUCUUCUGUCAUUG	1096
AAUUGAUGACAGCAUGUCA	359	AAUUGAUGACAGCAUGUCA	359	UGACAUUGCUGCAUCAUUC	1097
GCUGAAGGAGAGAGAUUGG	360	GCUGAAGGAGAGAGAUUGG	360	CCAUUCUCUCCUUCUAGC	1098
UAGGGAUUAUGGAAACAG	361	UAGGGAUUAUGGAAACAG	361	CUGUUUUCCAUAUCCCUA	1099
GAAAAUUGAUGAUUUCAG	362	GAAAAUUGAUGAUUUCAG	362	CUGAAAUUCUUAUUUUC	1100
CUACACCCUGUCAACAUAAU	363	CUACACCCUGUCAACAUAAU	363	AUUUAGUUGACAGGUGUAG	1101
ACAGAUGGCAGGUGAUGAU	364	ACAGAUGGCAGGUGAUGAU	364	AUCAUACCCUGCCAUCUGU	1102
CCACAGGGGAGGAAAGGAU	365	CCACAGGGGAGGAAAGGAU	365	AUCCUUUCCAUCUCCUGUGG	1103
UUAGGGGAUUAUGGAAACAA	366	UUAGGGGAUUAUGGAAACAA	366	UGUUUUCCAUAUCCCUAA	1104
AGAUGCUGCAUUAAGCAG	367	AGAUGCUGCAUUAAGCAG	367	CUGCUUAUAUGCAGCAUCU	1105
AAUAGCAACAGACAUACAA	368	AAUAGCAACAGACAUACAA	368	UUGUAUGUCUGUUGCUAUU	1106
AAUUCAAAAUUUCGGGUU	369	AAUUCAAAAUUUCGGGUU	369	AACCCGAAAAUUUGAAUU	1107
CAGACUCACAUAUUGCAUU	370	CAGACUCACAUAUUGCAUU	370	AAUGCAUAUUGUGAGUCUG	1108
UAUGCAUUAAGGAUUAUUC	371	UAUGCAUUAAGGAUUAUUC	371	GAAUGAUUCCUAAUGCAUA	1109
UACACCCUGUCAACAUAAU	372	UACACCCUGUCAACAUAAU	372	AAUUAUGUUGACAGGUGUA	1110
UGGAGGAAUUGAACAGUA	373	UGGAGGAAUUGAACAGUA	373	UACUUGUUAUUCUCCCA	1111
ACCAAGGGGAAGUGACAU	374	ACCAAGGGGAAGUGACAU	374	UAUGUCACUUCUCCUUGGU	1112
GAGAUUGGUGCGAGAGCGU	375	GAGAUUGGUGCGAGAGCGU	375	ACGCUCUCGCGACCCAUUC	1113
UAUAGGUACAGUAUUAUGA	376	UAUAGGUACAGUAUUAUGA	376	UACUAAUACUGUACCUAUA	1114
AUUAGGGAUUAUGGAAAC	377	AUUAGGGAUUAUGGAAAC	377	GUUUUCCAUAUCCCUAAU	1115
UGGCUGUGGAAAGAUACCU	378	UGGCUGUGGAAAGAUACCU	378	AGGUUAUUCUCCACAGCCA	1116
GAGAGAUUGGUGCGAGAGC	379	GAGAGAUUGGUGCGAGAGC	379	GCUCUCGCGACCCAUUCUC	1117
CCUACACCCUGUCAACAUAA	380	CCUACACCCUGUCAACAUAA	380	UUUAGUUGACAGGUGUAGG	1118
CAGCAGUACAAUUGGCAGU	381	CAGCAGUACAAUUGGCAGU	381	ACUGCCAUUUGUACUGCUG	1119
GGCUGUGGAAAGAUACCUA	382	GGCUGUGGAAAGAUACCUA	382	UAGGUUAUUCUCCACAGCC	1120
AGAAAAUUAUGAUAUUAU	383	AGAAAAUUAUGAUAUUAU	383	UGAAAAUUAUUAUUAUUCU	1121
GCCACCUUUGCCUAGUGUU	384	GCCACCUUUGCCUAGUGUU	384	AACACUAGGCAAGGUGGC	1122
GAUGCUGCAUAUAAGCAGC	385	GAUGCUGCAUAUAAGCAGC	385	GCUGCUUAUAUGCAGCAUC	1123
GCUAUAGGUACAGUAUUAU	386	GCUAUAGGUACAGUAUUAU	386	CUAAUACUGUACCUUAUAGC	1124
AACAGAUUGCAGGUGAUGA	387	AACAGAUUGCAGGUGAUGA	387	UCAUACCCUGCCAUCUGUU	1125
AUCACUCUUGGCAACGAC	388	AUCACUCUUGGCAACGAC	388	GUCGUUGGCCAAAGAGUGAU	1126
ACAUGCCUGUGUACCCACA	389	ACAUGCCUGUGUACCCACA	389	UGUGGGUACACAGGCAUGU	1127
ACAGCAGUACAAUUGGCAG	390	ACAGCAGUACAAUUGGCAG	390	CUGCCAUUUGUACUGCUGU	1128

AUGCAUUAAGGAUUAUUA	391	AUGCAUUAAGGAUUAUUA	391	UGAAUGAUUCCUUAUUGCAU	1129
AAUUGGAGGUUUUAUCAA	392	AAUUGGAGGUUUUAUCAA	392	UUUGAUAAAACCUCCAAUU	1130
UUGGAGGAAAUGAACAAGU	393	UUGGAGGAAAUGAACAAGU	393	ACUUGUUAUUAUCCUCCAA	1131
AUUGGAGGAAAUGAACAAG	394	AUUGGAGGAAAUGAACAAG	394	CUUGUUAUUAUCCUCCAAU	1132
AAAAUUAUUAUUAUUCGG	395	AAAAUUAUUAUUAUUCGG	395	CCGAAAAUUUGAAUUUUU	1133
AGGUGAAGGGGCGAGUAGU	396	AGGUGAAGGGGCGAGUAGU	396	UACUACUGCCCUUCCUCCU	1134
CUAUAGGUACAGUAUUAU	397	CUAUAGGUACAGUAUUAU	397	ACUAAUACUGUACCUUAUAG	1135
AUUAAAGCCAGGAUUGGAU	398	AUUAAAGCCAGGAUUGGAU	398	AUCCAUUCCUGGCUUUAAU	1136
GGAGGAAUUGAACAGUAG	399	GGAGGAAUUGAACAGUAG	399	CUACUUGUUAUUAUCCUCC	1137
AGCAGUACAAUUGGCAGUA	400	AGCAGUACAAUUGGCAGUA	400	UACUGCCAUUUGUACUGCU	1138
AUCAGUACAAUUGGCUUCC	401	AUCAGUACAAUUGGCUUCC	401	GGAAGCAUUAUGUACUGAU	1139
UAUUGGGUACCUUGUGGGA	402	UAUUGGGUACCUUGUGGGA	402	UCCACACAGGUACCCCAUA	1140
AGAGAUUGGUGCGAGAGCG	403	AGAGAUUGGUGCGAGAGCG	403	CGCUCUCGCGACCCAUUCU	1141
GGUGAAGGGGCGAGUAGUA	404	GGUGAAGGGGCGAGUAGUA	404	UUACUACUGCCCUUCCACC	1142
GUGAAGGGGCGAGUAGUAU	405	GUGAAGGGGCGAGUAGUAU	405	AUUACUACUGCCCUUCCAC	1143
CGCAGGACUCGGCUUUCUG	406	CGCAGGACUCGGCUUUCUG	406	CAGCAAGCCGAGUCCUGCG	1144
CACAUUGCCUGUGUACCCAC	407	CACAUUGCCUGUGUACCCAC	407	GUGGGUACACAGGCAUGUG	1145
GAGAGAGAUUGGUGCGAGA	408	GAGAGAGAUUGGUGCGAGA	408	UCUCGCGACCCAUUCUCUC	1146
UAGAAGGAGAGAGAUUGGU	409	UAGAAGGAGAGAGAUUGGU	409	ACCCAUUCUCUCCUCCUUA	1147
CACAGGGGAGGAAAGGAUC	410	CACAGGGGAGGAAAGGAUC	410	GAUCCUUUCCAUCCUUGUG	1148
GGCAGGAAGGAGCGGAGAC	411	GGCAGGAAGGAGCGGAGAC	411	GUCUCCGCUUCUCCUCCUGC	1149
UCCCCAAAGUCAAGGAGUA	412	UCCCCAAAGUCAAGGAGUA	412	UACUCCUUGACUUGUGGGA	1150
CCUGUACAAUUAUUGGAA	413	CCUGUACAAUUAUUGGAA	413	UUCCAAUUAUUGUAGCAGG	1151
UAUCAGUACAAUUGGCUUC	414	UAUCAGUACAAUUGGCUUC	414	GAAGCACAUGUACUGGAUA	1152
UGAAGGGGCGAGUAGUAUA	415	UGAAGGGGCGAGUAGUAUA	415	UAUUAUACUGCCCUUCCUA	1153
CUCAGAUUGCUGCAUUAAG	416	CUCAGAUUGCUGCAUUAAG	416	CUUAUAUGCAGCAUCUGAG	1154
ACAGGGGAGGAAAGGAUCA	417	ACAGGGGAGGAAAGGAUCA	417	UGAUCCUUUCCAUCCUUGU	1155
AAGAAAAGGGGGGAUUGGG	418	AAGAAAAGGGGGGAUUGGG	418	CCCAUCCUCCUCCUCCUUCU	1156
UCAUUAAGGGAUUAUGGAA	419	UCAUUAAGGGAUUAUGGAA	419	UUUCCAUAAUCCCUAUAUG	1157
GAAGGAGAGAGAUUGGUGC	420	GAAGGAGAGAGAUUGGUGC	420	GCACCCAUUCUCCUCCUUC	1158
GUUAAACAAUUGGCAUUGA	421	GUUAAACAAUUGGCAUUGA	421	UCAUUGGCGCAUUGUUAAC	1159
AUGGACAAGUAGACUGUAG	422	AUGGACAAGUAGACUGUAG	422	CUACAGUCUACUUGUCCAU	1160
UAGUAGAUUUUCAGAGAACU	423	UAGUAGAUUUUCAGAGAACU	423	AGUUCUCUGAAUUCUACUA	1161
CUGUCAACAUUAUUGGAAG	424	CUGUCAACAUUAUUGGAAG	424	CUUCCAAUUAUGUAGACAG	1162
GGGGCAGUAGUAUUAACAAG	425	GGGGCAGUAGUAUUAACAAG	425	CUUGUAUUAUACUAGCCUCC	1163
CAUUAAGGGAUUAUGGAAAA	426	CAUUAAGGGAUUAUGGAAAA	426	UUUUCCAUAAUCCCUAUAUG	1164

GAACUACUAGUACCCUUA	427	GAACUACUAGUACCCUUA	427	UGAAGGGUACUAGUAGUUC	1165
GCAGGAAGCACUAGGGCG	428	GCAGGAAGCACUAGGGCG	428	CGCCCAUAGUCUUCUCCG	1166
AAGGAGAGAGAUGGGUGCG	429	AAGGAGAGAGAUGGGUGCG	429	CGCACCAUCUCUCUCCU	1167
CAGGAUUGGAUGGCCCAA	430	CAGGAUUGGAUGGCCCAA	430	UUUGGGCAUCCAUUCCUG	1168
GGAAUUGAACAGUAGAU	431	GGAAUUGAACAGUAGAU	431	UAUCUACUUGUUCUUCU	1169
AAAAGACACCAAGGAAGCU	432	AAAAGACACCAAGGAAGCU	432	AGCUUCUUGUGUCUUCU	1170
AUCAUUAAGCACACACAG	433	AUCAUUAAGCACACACAG	433	CUGGUUGUGCUUGAAGAU	1171
AACAAGUAGUAAAUUAGU	434	AACAAGUAGUAAAUUAGU	434	ACUAAUUUAUCUACUUGU	1172
AGGAAUUGAACAGUAGAU	435	AGGAAUUGAACAGUAGAU	435	AUCUACUUGUUCUUCU	1173
GCAGGACUCGGCUUGCUGA	436	GCAGGACUCGGCUUGCUGA	436	UCAGCAAGCCGAGUCCUG	1174
GAUUAUUAAGCACACAC	437	GAUUAUUAAGCACACAC	437	GGUUGUGCUUGAAGAUUC	1175
CCUCAGAUUGCUCAUUA	438	CCUCAGAUUGCUCAUUA	438	UUAUUGCAGCAUCUGAGG	1176
GAUGGAAAGGAUACCCAGC	439	GAUGGAAAGGAUACCCAGC	439	GCUGGUGAUCCUUCUCC	1177
AGGAGAGAGAUGGGUGCGA	440	AGGAGAGAGAUGGGUGCGA	440	UCGCACCAUCUCUCCU	1178
CAUGGACAAGUAGACUGUA	441	CAUGGACAAGUAGACUGUA	441	UACAGUCUACUUGUCCAU	1179
UCAGAUUGCUCAUUAAGC	442	UCAGAUUGCUCAUUAAGC	442	GCUUAUUGCAGCAUCUGA	1180
AUGGAGAAAUUAGUAGAU	443	AUGGAGAAAUUAGUAGAU	443	AUCUACUAAUUUCUCCAU	1181
GAGAAAUUAGUAGAUUUC	444	GAGAAAUUAGUAGAUUUC	444	GAAAUUCUAAUUUUCUC	1182
AUGACAGCAUGUCAGGGAG	445	AUGACAGCAUGUCAGGGAG	445	CUCCUGCAGCAUCUGU	1183
AGGCCAGAUAGAGAAACCA	446	AGGCCAGAUAGAGAAACCA	446	UGGUUCUCUCCUUGGCCU	1184
AGAGAGAUUGGGUGCGAGAG	447	AGAGAGAUUGGGUGCGAGAG	447	CUCUCGCACCAUCUCUCU	1185
ACCAUGUUUUCAGCAUUA	448	ACCAUGUUUUCAGCAUUA	448	UAAUGCUGAAACAUUGGU	1186
GAUGACAGCAUGUCAGGGA	449	GAUGACAGCAUGUCAGGGA	449	UCCUGACAUUGCUCAUC	1187
AGCCAGGAUUGGAUGGCC	450	AGCCAGGAUUGGAUGGCC	450	GGGCCAUCCAUUCCUGGCCU	1188
UGAUGACAGCAUGUCAGGG	451	UGAUGACAGCAUGUCAGGG	451	CCUUGCAUGCUGUCAUCA	1189
CAGGAAGCACUAGGGCGC	452	CAGGAAGCACUAGGGCGC	452	GCGCCCAUAGUGCUUCCUG	1190
ACAGACUCACAAUUAUGCAU	453	ACAGACUCACAAUUAUGCAU	453	AUGCAUUAUUGAGUCUGU	1191
UGGAGGUUUUUAUCAAAGUA	454	UGGAGGUUUUUAUCAAAGUA	454	UACUUUGAUAUAAACUCCA	1192
AAGCCAGGAUUGGAUGGCC	455	AAGCCAGGAUUGGAUGGCC	455	GGCCAUCCAUUCCUGGCUU	1193
UUUUGACUAGCGGAGGCUA	456	UUUUGACUAGCGGAGGCUA	456	UAGCCUCCGUAUGCAAAA	1194
CAGAUUGCUCAUUAAGCA	457	CAGAUUGCUCAUUAAGCA	457	UGCUUAUUGCAGCAUCUG	1195
UUGGGCCUGAAAUCCAUA	458	UUGGGCCUGAAAUCCAUA	458	UAUGGAUUUUCAGGCCCAA	1196
GCAUGGACAAGUAGACUGU	459	GCAUGGACAAGUAGACUGU	459	ACAGUCUACUUGUCCAU	1197
ACCUGUCAACAUAUUGGA	460	ACCUGUCAACAUAUUGGA	460	UCCAAUUAUGUAGACAGGU	1198
CAGGAACUACUAGUACCCU	461	CAGGAACUACUAGUACCCU	461	AGGGUACUAGUAGUCCUG	1199
AUAGCAACAGACAUACAAA	462	AUAGCAACAGACAUACAAA	462	UUUGUAUGUCUGUUGCUAU	1200

GGAGAGAGAUGGGUGCGAG	463	GGAGAGAGAUGGGUGCGAG	463	CUCGCACCAUCUCUCUCC	1201
ACACCUUGUCAACAUAAUUG	464	ACACCUUGUCAACAUAAUUG	464	CAAUUAUGUUGACAGGUGU	1202
AGAAUUGAUGACAGCAUGU	465	AGAAUUGAUGACAGCAUGU	465	ACAUGCUGUACUAAUUCU	1203
AGAAGGAGAGAGAUGGGUG	466	AGAAGGAGAGAGAUGGGUG	466	CACCAUCUCUCUCCUUCU	1204
AAUCAUUAAGCACACCA	467	AAUCAUUAAGCACACCA	467	UGGUUGUGCUUGAAGAUU	1205
CAAAAAUUGGGCCUGAAAA	468	CAAAAAUUGGGCCUGAAAA	468	UUUUCAGGCCCAAUUUUUG	1206
GCAGUACAAUUGCCAGUUA	469	GCAGUACAAUUGCCAGUUA	469	AUUGCCAUUUUGUACUGC	1207
GGGCAGUAGUAAUACAAGA	470	GGGCAGUAGUAAUACAAGA	470	UCUUGUAUUACUACUGCC	1208
UCAUUAAGCACACACCA	471	UCAUUAAGCACACACCA	471	UCUGGUUGUGCUUGAAGU	1209
AUGAUGACAGCAUGUCAGG	472	AUGAUGACAGCAUGUCAGG	472	CCUGACAUUGCUGUACAU	1210
GAACAAGUAGUAAAUUAG	473	GAACAAGUAGUAAAUUAG	473	CUAAUUUAUCUACUUGUUC	1211
UGACAGCAUGUCAGGGAGU	474	UGACAGCAUGUCAGGGAGU	474	ACUCCUGACAUUGCUGUA	1212
GGAAUACUAGUACCCUUC	475	GGAAUACUAGUACCCUUC	475	GAGGGUACUAGUAGUUC	1213
CACCUUGUCAACAUAAUUG	476	CACCUUGUCAACAUAAUUG	476	CCAAUUUAUGUAGACAGGU	1214
GGCCAGAUAGAGAAACCA	477	GGCCAGAUAGAGAAACCA	477	UUGGUUCUCUACUUGGCC	1215
UGUGUACCCACAGACCCCA	478	UGUGUACCCACAGACCCCA	478	UGGGGUGUGUGGUAACACA	1216
GGAAUUAUUAAGCACAC	479	GGAAUUAUUAAGCACAC	479	GUUGUGCUUGAAGAUUCC	1217
CAGUACAAUUGGCAGUUAU	480	CAGUACAAUUGGCAGUUAU	480	AAUACUGCCAUUUGUACUG	1218
GCAGGAAGAGCGGAGACA	481	GCAGGAAGAGCGGAGACA	481	UGUCUCCGCUUCUCCUGC	1219
AAAGCCAGGAUUGGAUGGC	482	AAAGCCAGGAUUGGAUGGC	482	GCCAUCCAUUCCUGGCCUU	1220
UGAAACAAGUAGUAAAUUA	483	UGAAACAAGUAGUAAAUUA	483	UAAUUUAUCUACUUGUUA	1221
CAAAAAUUCAAAAUUUCG	484	CAAAAAUUCAAAAUUUCG	484	CGAAAAUUUGAAUUUUUG	1222
UAGGACCUACACCUUGUCAA	485	UAGGACCUACACCUUGUCAA	485	UUAGACAGGUGUAGGUCCUA	1223
GCCAGAUAGAGAAACCAAG	486	GCCAGAUAGAGAAACCAAG	486	CUUGGUUCUCUACUUGGC	1224
GACAGCUGGACUGUCAUUG	487	GACAGCUGGACUGUCAUUG	487	CAUUGACAGUCCAGCUGUC	1225
AAAGCCACCUUUGCCUAGU	488	AAAGCCACCUUUGCCUAGU	488	ACUAGGCAAGGGUGGCCUU	1226
GAAUUGAACAGUAGAUAA	489	GAAUUGAACAGUAGAUAA	489	UUAUCUACUUGUACAUUUC	1227
ACAAUUUUAAGAAAGG	490	ACAAUUUUAAGAAAGG	490	CCUUUUCUUUUAUUUUGU	1228
GCUGUGGAAAGAUACCUAA	491	GCUGUGGAAAGAUACCUAA	491	UUAAGGUACUUUCCACAGC	1229
UGUCAACAUAAUUGGAAGA	492	UGUCAACAUAAUUGGAAGA	492	UCUUCCAAUUUAGUUGACA	1230
UAAAGAAAGGGGGGAUU	493	UAAAGAAAGGGGGGAUU	493	AAUCCCCUUUUUUUUUA	1231
CAUUUUUUAAGAAAGGG	494	CAUUUUUUAAGAAAGGG	494	CCUUUUUUUUUUUUUUUG	1232
UAGUAGAUUUUCAGAAC	495	UAGUAGAUUUUCAGAAC	495	GUUCUCUGAAACUACUAA	1233
AAUUUUUUAAGAAAGGGG	496	AAUUUUUUAAGAAAGGGG	496	CCUUUUUUUUUUUUUUUU	1234
UAGCAACAGACAUACAAAC	497	UAGCAACAGACAUACAAAC	497	GUUUGUAUGUCUGUUGCUA	1235
UGGAACAAGCCCCAGAGA	498	UGGAACAAGCCCCAGAGA	498	UCUUCUGGGCUUGUCCA	1236

AGGAUGAGGAUUAAGACAU	499	AGGAUGAGGAUUAAGACAU	499	AUGUUCUAAUCCUCAUCCU	1237
GACAAUUGGAGAAGUGAAU	500	GACAAUUGGAGAAGUGAAU	500	AUUCACUUCUCCAAUUGUC	1238
ACAGACCCCAACCCACAAG	501	ACAGACCCCAACCCACAAG	501	CUUGUGGGUUGGGGUCUGU	1239
CACCUAGAACUUUAAUUGC	502	CACCUAGAACUUUAAUUGC	502	GCAUUUAAAGUUUCUAGGUG	1240
GAGCCAAACAGCCCAACAG	503	GAGCCAAACAGCCCAACAG	503	CUGGUGGGGUGUGUGGUC	1241
AGGACCUACACCUUGUCAAC	504	AGGACCUACACCUUGUCAAC	504	GUUGACAGGUGUAGGUCCU	1242
UUACAAAAUUCAAAAUUU	505	UUACAAAAUUCAAAAUUU	505	AAAUUUUGAAUUUUUGUAA	1243
GGAGGUUUUAUCAAAGUAA	506	GGAGGUUUUAUCAAAGUAA	506	UUACUUUGAAUAAACUCC	1244
CUGGCUGUGGAAAGAUACC	507	CUGGCUGUGGAAAGAUACC	507	GGUUAUUUCCACAGCCAG	1245
GGAGAAGUGAAUUUAUUA	508	GGAGAAGUGAAUUUAUUA	508	UUUAUUAUUCACUUCUCC	1246
AAUGAUGACAGCAUGUCAG	509	AAUGAUGACAGCAUGUCAG	509	CUGACAUUGCUGCAUCAUU	1247
AUCAUUAUGGGAUUUUGGAA	510	AUCAUUAUGGGAUUUUGGAA	510	UUCCAUUAUCCCUAAUGAU	1248
UCAAUUUUGGGCCUGAAA	511	UCAAUUUUGGGCCUGAAA	511	UUUCAGGCCCAUUUUUGA	1249
ACCUACACCUUGUCAACAU	512	ACCUACACCUUGUCAACAU	512	UAUGUUUGACAGGUGUAGGU	1250
GAUGAGGAUUAAGACAUUG	513	GAUGAGGAUUAAGACAUUG	513	CCAUGUUCUUAUCCUCAUC	1251
ACAGCUGGACUGUCAUUA	514	ACAGCUGGACUGUCAUUA	514	UCAUUGACAGUCCAGCUGU	1252
CCUCAGAUUGCUGCAUUA	515	CCUCAGAUUGCUGCAUUA	515	UAUUAUGCAGCAUCUGAGGG	1253
AUUAGUAGAUUUCAGAGAA	516	AUUAGUAGAUUUCAGAGAA	516	UUCUCUGAAAUUACUAAU	1254
AGAAAGAGCAGAGACAGU	517	AGAAAGAGCAGAGACAGU	517	ACUGUCUUCUGCUCUUCU	1255
GACCUACACCUUGUCAACAU	518	GACCUACACCUUGUCAACAU	518	AUGUUUGACAGGUGUAGGUC	1256
CACUCUUUGGCAACGACCC	519	CACUCUUUGGCAACGACCC	519	GGGUCUGUCCAAAGAGUG	1257
AUGAGGAUUUAAGACAUUGA	520	AUGAGGAUUUAAGACAUUGA	520	UCCAUUGUUAUCCUCAU	1258
AUUUUAAAAGAAAAGGGGG	521	AUUUUAAAAGAAAAGGGGG	521	CCCCUUUUUUUUUUUUUU	1259
AGAAUUUUAUUGCAUGGG	522	AGAAUUUUAUUGCAUGGG	522	CCCAUGCAUUUAAAGUUCU	1260
AUCUAUCAUACAUGGAUG	523	AUCUAUCAUACAUGGAUG	523	CAUCCAUGUAUUGAUAGAU	1261
AUGGAACAAGCCCAGAAG	524	AUGGAACAAGCCCAGAAG	524	CUUCUGGGGCUUGUCCAU	1262
UUUAGACCAUCAAAGAC	525	UUUAGACCAUCAAAGAC	525	GUCUUUUGAGGGGCUAAU	1263
CACAAUUUUAAAAGAAAAG	526	CACAAUUUUAAAAGAAAAG	526	CUUUUUUUUUUUUUUUUG	1264
GAACUUUUAUUGCAUGGGU	527	GAACUUUUAUUGCAUGGGU	527	ACCAUGCAUUUAAAGUUC	1265
AAAAGAAAAGGGGGGAUUG	528	AAAAGAAAAGGGGGGAUUG	528	CAUUGCCCCUUUUUUUUU	1266
GGUAGGAAAGGAUACACAG	529	GGUAGGAAAGGAUACACAG	529	CUGGUGAUCUUUCCAUCC	1267
AGGGGCAGUAGUAAUACAA	530	AGGGGCAGUAGUAAUACAA	530	UUGUAUUUACUACUCCCU	1268
AAAGGGGGGAUUGGGGGGU	531	AAAGGGGGGAUUGGGGGGU	531	ACCCCCCAUCCCCCUUU	1269
AAGGGGGGAUUGGGGGGUA	532	AAGGGGGGAUUGGGGGGUA	532	UACCCCCCAUCCCCCUUU	1270
CAGGAUGAGGAUUUAAGACA	533	CAGGAUGAGGAUUUAAGACA	533	UGUUCUAAUCCUCAUCCUG	1271
AAAAUAGUAGAUUUCAGA	534	AAAAUAGUAGAUUUCAGA	534	UCUGAAUUCUACUAAUUU	1272

GAAUUGGAGGAAUUAAGACA	535	GAAUUGGAGGAAUUAAGACA	535	UGUUCAUUUUCCUCCAAUUC	1273
UACAAAAUUCAAAAUUUU	536	UACAAAAUUCAAAAUUUU	536	AAAAUUUUGAAUUUUUGUA	1274
AGGAACUACUAGUACCCUU	537	AGGAACUACUAGUACCCUU	537	AAGGGUACUAGUAGUCCU	1275
AAAAGAAAAGGGGGGAUUG	538	AAAAGAAAAGGGGGGAUUG	538	CCAAUCCCCCUUUUUUUU	1276
AAAAUUGGAGUACAGAAA	539	AAAAUUGGAGUACAGAAA	539	UUUCUUGCAUCCAAUUUUU	1277
ACAGGAUGAGGAUUAAGAAC	540	ACAGGAUGAGGAUUAAGAAC	540	GUUCUAAUCCUCAUCCUGU	1278
ACAAUUGGAGAAGUGAAUU	541	ACAAUUGGAGAAGUGAAUU	541	AAUUCACUUCUCCAAUUGU	1279
GGUAGGGAUUAAGAACAU	542	GGUAGGGAUUAAGAACAU	542	CAUGUUCUAAUCCUCCAUCC	1280
UCACCUAGAACUUUAAUUG	543	UCACCUAGAACUUUAAUUG	543	CAUUUAAAGUUCUAGGUGA	1281
AUUGGGCCUGAAAAUCCAU	544	AUUGGGCCUGAAAAUCCAU	544	AUGGAUUUUCAGGCCCAAU	1282
AAUUGGGCCUGAAAAUCCA	545	AAUUGGGCCUGAAAAUCCA	545	UGGAUUUUCAGGCCCAAUU	1283
GGACCUACACCUUGUCAACA	546	GGACCUACACCUUGUCAACA	546	UGUUGACAGGUGUAGGUCC	1284
GACAGGAUGAGGAUUAAGAA	547	GACAGGAUGAGGAUUAAGAA	547	UUCUAAUCCUCAUCCUGUC	1285
UCUAUCAUACAUGGAUGA	548	UCUAUCAUACAUGGAUGA	548	UCAUCCAUUGUAGUAGUA	1286
GGAAUUGGAGGAAUUAAGAAC	549	GGAAUUGGAGGAAUUAAGAAC	549	GUUCAUUUCCUCCAAUCC	1287
AAAAGGGGGGAUUGGGGGG	550	AAAAGGGGGGAUUGGGGGG	550	CCCCCAUCCCCCUUUUU	1288
AAAAUUGGAUGACAGAAAC	551	AAAAUUGGAUGACAGAAAC	551	GUUUCUGUACUCCAAUUUU	1289
CAAUUGGAGAAGUGAAUUU	552	CAAUUGGAGAAGUGAAUUU	552	UAUUUACUUCUCCAAUUG	1290
AUGACCCAUCAAAGACUU	553	AUGACCCAUCAAAGACUU	553	AAGUCUUUUGUAGUGGCUU	1291
CUUAAGCCUCAAUAAAGCU	554	CUUAAGCCUCAAUAAAGCU	554	AGCUUUUUGAGGCUUAAAG	1292
AGUACAAUGUCUCCACA	555	AGUACAAUGUCUCCACA	555	UGUGGAAGCACAUUGUACU	1293
UUUCCGUGGGGGAUUUCC	556	UUUCCGUGGGGGAUUUCC	556	GGAAUUCUCCAGCGGAAA	1294
CAGACAUCAAACUAAAGA	557	CAGACAUCAAACUAAAGA	557	UCUUUAGUUUGUAGUCUG	1295
UUUAGCCUCAAUAAAGCUU	558	UUUAGCCUCAAUAAAGCUU	558	AAGCUUUUUGAGGCUUAA	1296
GGACAAUUGGAGAAUGUAA	559	GGACAAUUGGAGAAUGUAA	559	UUCACUUCUCCAAUUGUCC	1297
GGUUGGGGGUACAGUGC	560	GGUUGGGGGUACAGUGC	560	GCACUGUACCCCCCAAUCC	1298
AAUUGGGCCUGAAAAUCC	561	AAUUGGGCCUGAAAAUCC	561	GGAUUUUUCAGGCCCAAUUU	1299
GGGGGAUUGGGGGUACAG	562	GGGGGAUUGGGGGUACAG	562	CUGUACCCCCCAUCCCCC	1300
GUGGGGGGACAUCAAGCAG	563	GUGGGGGGACAUCAAGCAG	563	CUGCUUGAUGUCCCCAC	1301
UCCUGGCUGUGGAAAGAU	564	UCCUGGCUGUGGAAAGAU	564	UAUUCUUCCACAGCCAGGA	1302
ACAAAAUUCAAAAUUUUC	565	ACAAAAUUCAAAAUUUUC	565	GAAAAUUUUGAAUUUUUGU	1303
GGGGAUUGGGGGUACAGU	566	GGGGAUUGGGGGUACAGU	566	ACUGUACCCCCCAUCCCC	1304
UAAACACAGUGGGGGGACA	567	UAAACACAGUGGGGGGACA	567	UGUCCCCCACUGUGUUUA	1305
CAGACCCCAACCCACAAGA	568	CAGACCCCAACCCACAAGA	568	UCUUUGGGGUUGGGGUCUG	1306
AGGGGCAAUUGGUACAUA	569	AGGGGCAAUUGGUACAUA	569	UGAUGUACCAUUGCCCUU	1307
AAUUGGAGGAAUUAAGACA	570	AAUUGGAGGAAUUAAGACA	570	UUGUUCAUUCCUCCAAUU	1308

AAGCCACCUUUGCCUAGUG	571	AAGCCACCUUUGCCUAGUG	571	CACUAGGCAAAGGUGGCUU	1309
CCAUGUUUUCAGCAUUAUC	572	CCAUGUUUUCAGCAUUAUC	572	GAUAAUGCUGAAAACUUG	1310
AAAGAAAAAUCAGUAACA	573	AAAGAAAAAUCAGUAACA	573	UGUUACUGAUUUUUUCUUU	1311
AAAAAAUUGGAUGACAGAA	574	AAAAAAUUGGAUGACAGAA	574	UUCUGCAUCCAAUUUUUU	1312
CAGUACAAGUGGCUUCCAC	575	CAGUACAAGUGGCUUCCAC	575	GUGGAAGCACAUGUACUG	1313
CUUUCCGCGUGGGGACUUUC	576	CUUUCCGCGUGGGGACUUUC	576	GAAAGUCCCCAGCGGAAAG	1314
GCAACAGACAUACAACUA	577	GCAACAGACAUACAACUA	577	UAGUUUGAUUGUCUGUUUG	1315
UAUCACCUAGAACUUUAAA	578	UAUCACCUAGAACUUUAAA	578	UUUAAAGUUCUAGGUGAUA	1316
ACCCACAGACCCCAACCCA	579	ACCCACAGACCCCAACCCA	579	UGGGUUGGGGUCUGGGGU	1317
GAUAGAUUGGAACAAGCCCC	580	GAUAGAUUGGAACAAGCCCC	580	GGGGCUUGUUCCAUCUAUC	1318
GCUUAAAGCCUCAUAAAGC	581	GCUUAAAGCCUCAUAAAGC	581	GCUUUAUUGAGGCUUAAAG	1319
AUUGGGGGGUACAGUGCAG	582	AUUGGGGGGUACAGUGCAG	582	CUGCACUGUACCCCCAAU	1320
CCCACAGACCCCAACCCAC	583	CCCACAGACCCCAACCCAC	583	GUGGGUUGGGGUCUGUGGG	1321
AAAAUUGGGCCUGAAAAUC	584	AAAAUUGGGCCUGAAAAUC	584	GAUUUUCAGGCCCAUUUUU	1322
CAUUCAGCACAACCCAGAU	585	CAUUCAGCACAACCCAGAU	585	AUCUGGUUGGCUUGAAUG	1323
ACUUUAAUUGCAUGGGUAA	586	ACUUUAAUUGCAUGGGUAA	586	UUACCCAUUGCAUUUAAAGU	1324
UAGAACUUUAAUUGCAUGG	587	UAGAACUUUAAUUGCAUGG	587	CCAUUGCAUUUAAAGUUCUA	1325
CUUUAAUUGCAUGGGUAAA	588	CUUUAAUUGCAUGGGUAAA	588	UUUACCAUGCAUUUAAAG	1326
GGGAUUGGGGGGUACAGUG	589	GGGAUUGGGGGGUACAGUG	589	CACUGUACCCCCAAUCCG	1327
UAUGACCCAUCAAAAGACU	590	UAUGACCCAUCAAAAGACU	590	AGUCUUUUGAUUGGGUCAUA	1328
GAAGAAGCGGAGACAGCGA	591	GAAGAAGCGGAGACAGCGA	591	UCGCGUUCGCCGCUUCUUC	1329
CCCAUGUUUUCAGCAUUAU	592	CCCAUGUUUUCAGCAUUAU	592	AUAUUGCUGAAAAACUUGG	1330
AGGAUUGGAGGAAUUGAA	593	AGGAUUGGAGGAAUUGAA	593	UUCAUUUCCUCCAAUCCU	1331
AGAGACAGGCUAAUUUUUU	594	AGAGACAGGCUAAUUUUUU	594	AAAAUUUAGCCUGUCUCU	1332
AAGUAGAUAAUUGAGUCAG	595	AAGUAGAUAAUUGAGUCAG	595	CUGACUAAUUUAUCUACUU	1333
AUGUUUUCAGCAUUAUCAG	596	AUGUUUUCAGCAUUAUCAG	596	CUGAAUAAUGCUGAAACAU	1334
UUUUGUCUGGUUAUAGUGC	597	UUUUGUCUGGUUAUAGUGC	597	GCACUUAACAGACAUAUA	1335
AUUACAAAAUUCAAAAUU	598	AUUACAAAAUUCAAAAUU	598	AAUUUUGAAUUUUUGAAU	1336
GCCAGGAUUGGAUGGCCCA	599	GCCAGGAUUGGAUGGCCCA	599	UGGGCCAUCCAUUCUGGC	1337
CCUGGCUUGGAAAGAUAC	600	CCUGGCUUGGAAAGAUAC	600	GUUACUUUCCACAGCCAGG	1338
UGUUUUCAGCAUUAUCAGA	601	UGUUUUCAGCAUUAUCAGA	601	UCUGAAUAAUGCUGAAAAA	1339
ACCUAGAACUUUAAUUGCA	602	ACCUAGAACUUUAAUUGCA	602	UGCAUUUAAAGUUCUAGGU	1340
GGGAUGGAAAGGAUACCCA	603	GGGAUGGAAAGGAUACCCA	603	UGGUGAUCCUUUCCAUCCC	1341
AAUUAAGCCAGGAUUGGA	604	AAUUAAGCCAGGAUUGGA	604	UCCAUUCCUGGCUUUAAUU	1342
AAAGGAUUGGAGGAAUUG	605	AAAGGAUUGGAGGAAUUG	605	CAUUUCCUCCAAUUCUUU	1343
ACUUUCCGCGUGGGGACUUU	606	ACUUUCCGCGUGGGGACUUU	606	AAAGUCCCCAGCGGAAAGU	1344

ACAGAAGAAAAUAAAG	607	ACAGAAGAAAAUAAAG	607	CUUUUAAUUUUUUCUUCUGU	1345
AGCAACAGACAUACAACU	608	AGCAACAGACAUACAACU	608	AGUUUUGUAUGUCUGUUGCU	1346
UAUUGUCUGGUUAUAGUGCA	609	UAUUGUCUGGUUAUAGUGCA	609	UGCACUUAUACAGACAUAU	1347
UUAAAAAGAAAGGGGGGAU	610	UUAAAAAGAAAGGGGGGAU	610	AUCCCCCUUUUCUUUUA	1348
UGCUUAAAGCCUCAUAAAG	611	UGCUUAAAGCCUCAUAAAG	611	CUUUUUGAGGCUUAAAGCA	1349
CAGGAAGAUUGGCCAGUAAA	612	CAGGAAGAUUGGCCAGUAAA	612	UUUACUGGCCAUUCUCCUG	1350
CCAGAUAGAGAAACCAAGG	613	CCAGAUAGAGAAACCAAGG	613	CCUUGGUUCUCUACUUGG	1351
GAUUGGGGGGUACAGUGCA	614	GAUUGGGGGGUACAGUGCA	614	UGCACUGUACCCCCAAUC	1352
AAUUGAAACAAGUAGUAAA	615	AAUUGAAACAAGUAGUAAA	615	UUUUAUCUAGUUGUUAUUU	1353
AGCCACCUUUGCCUAGUGU	616	AGCCACCUUUGCCUAGUGU	616	ACACUAGGCAAAAGGUGGU	1354
GACUUUCCGCGUGGGGACUU	617	GACUUUCCGCGUGGGGACUU	617	AAGUCCCCAGCGGAAAGUC	1355
CCAGUAAAAUUAAGCCAG	618	CCAGUAAAAUUAAGCCAG	618	CUGGCUUUAAUUUACUGG	1356
GCAUUGUAUGGCCUCCCA	619	GCAUUGUAUGGCCUCCCA	619	UGGGAGGGGCAUACAUUGC	1357
AACUUUAAUUGCAUGGGUA	620	AACUUUAAUUGCAUGGGUA	620	UACCCAUUGCAUUUAAAGUU	1358
UUGGGGGGUACAGUGCAGG	621	UUGGGGGGUACAGUGCAGG	621	CCUGCACUGUACCCCCAA	1359
GGACUUUCCGCGUGGGGACU	622	GGACUUUCCGCGUGGGGACU	622	AGUCCCCAGCGGAAAGUCC	1360
CUAGAACUUUAAUUGCAUG	623	CUAGAACUUUAAUUGCAUG	623	CAUGCAUUUAAAGUUCUAG	1361
UCAGUACAAGUGGCUUCCA	624	UCAGUACAAGUGGCUUCCA	624	UGGAAGCACAUGUACUGA	1362
AAGGAUUGGAGGAAUUGA	625	AAGGAUUGGAGGAAUUGA	625	UCAUUUCCUCCAAUUCUU	1363
UACCCACAGACCCCAACCC	626	UACCCACAGACCCCAACCC	626	GGGUUGGGGUCUGUGGGUA	1364
GAGACAGGCUAAUUUUUUA	627	GAGACAGGCUAAUUUUUUA	627	UAAAAAUUAGCCUGUCUC	1365
CUGCUUAAAGCCUCAUAAA	628	CUGCUUAAAGCCUCAUAAA	628	UUUUAUUGAGGCUUAAAGCAG	1366
AGGAAGAUUGGCCAGUAAA	629	AGGAAGAUUGGCCAGUAAA	629	UUUUACUGGCCAUUCUCCU	1367
AGACAUACAACUAAAGAA	630	AGACAUACAACUAAAGAA	630	UUCUUUAGUUUGUUAUGCU	1368
CAUGUUUUCAGCAUUAUCA	631	CAUGUUUUCAGCAUUAUCA	631	UGAUAAUUGCUGAAACAU	1369
UUGGAAAGGACCGCAAG	632	UUGGAAAGGACCGCAAG	632	CUUUGGUGGUCCUUUCCAA	1370
GGCUGUUGGAAUUGUGGAA	633	GGCUGUUGGAAUUGUGGAA	633	UUCACAAUUUCCAAACAGCC	1371
UAAUUGGAGAAAAUAGUA	634	UAAUUGGAGAAAAUAGUA	634	UACUAAUUUUCUCCAUUA	1372
AGGAAGAGCGGAGACAGC	635	AGGAAGAGCGGAGACAGC	635	GCUGUCUCCGCUUCUCCU	1373
AAAAAGAAAAUUCAGUA	636	AAAAAGAAAAUUCAGUA	636	UACUGAUUUUUUCUUUUU	1374
AUCAGAAAGAACCUCAUU	637	AUCAGAAAGAACCUCAUU	637	AAUUGGAGGUUCUUUCUGAU	1375
AGACCCCAACCCACAAGAA	638	AGACCCCAACCCACAAGAA	638	UUCUUGUGGGUUGGGGUCU	1376
CAAGUAGAUAAUUGAGUCA	639	CAAGUAGAUAAUUGAGUCA	639	UGACUAAUUUAUCUACUUG	1377
AAAGCUUAGGUACAGUAU	640	AAAGCUUAGGUACAGUAU	640	AUACUGUACCAUUAUGCUU	1378
UGCUGCAUUAAGCAGCUG	641	UGCUGCAUUAAGCAGCUG	641	CAGCUGCUUUAUUGCAGCA	1379
UUUAAUUGCAUGGGUAAAA	642	UUUAAUUGCAUGGGUAAAA	642	UUUUAACCAUGCAUUUAAA	1380

UUUUCAGCAUUUACAGAAG	643	UUUUCAGCAUUUACAGAAG	643	CUUCUGAUAAUGCUGAAAA	1381
ACUGCUUAAAGCCUCAUUA	644	ACUGCUUAAAGCCUCAUUA	644	UUUUUAGGCGUUAAGCAGU	1382
GGAAAGGACCAGCAAAGCU	645	GGAAAGGACCAGCAAAGCU	645	AGCUUUGCUGGUCUUUCC	1383
UGUACCAGUAAAAUUAAG	646	UGUACCAGUAAAAUUAAG	646	CUUUUAAUUUACUGGUACA	1384
GAAGAAAAAUAAAAGCAU	647	GAAGAAAAAUAAAAGCAU	647	AUGCUUUUUUUUUUUCUUC	1385
GUGUACCCACAGACCCCAA	648	GUGUACCCACAGACCCCAA	648	UUGGGGUCUGUGGUACAC	1386
GGGGGGAUUGGGGGGUACA	649	GGGGGGAUUGGGGGGUACA	649	UGUACCCCCCAUCCCCC	1387
GGAGGAAGCGGAGACAGCG	650	GGAGGAAGCGGAGACAGCG	650	CGCUGUCUCCGCUUCUUC	1388
GAAGCGGAGACAGCGACGA	651	GAAGCGGAGACAGCGACGA	651	UCGUCGUCUGUCUCCGCUUC	1389
UUAAAUGCAUGGGUAAAAG	652	UUAAAUGCAUGGGUAAAAG	652	CUUUUACCCCAUGCAUUUA	1390
AACCCACUGCUUAAAGCCUC	653	AACCCACUGCUUAAAGCCUC	653	GAGGCUUAAAGCAGUGGGUU	1391
GUUUUCAGCAUUUACAGAA	654	GUUUUCAGCAUUUACAGAA	654	UUCUGAUAAUGCUGAAAAC	1392
GGAUUAAUAAAAUAGUAA	655	GGAUUAAUAAAAUAGUAA	655	UUACUAAUUUAAUUUAUCC	1393
GUACCCACAGACCCCAACC	656	GUACCCACAGACCCCAACC	656	GGUUGGGGUCUGUGGGUAC	1394
GAUUAAUAAAAUAGUAA	657	GAUUAAUAAAAUAGUAA	657	CUUACUAAUUUUUUUAUUC	1395
AAGCCUCAUAAAAGCUUGC	658	AAGCCUCAUAAAAGCUUGC	658	GCAAGCUUUAUUGAGGCUU	1396
GCAGGACAUAAAGAGGUAG	659	GCAGGACAUAAAGAGGUAG	659	CUACUGGUUUUAUUGCCUGC	1397
CCCACUGCUUAAAGCCUCA	660	CCCACUGCUUAAAGCCUCA	660	UUGAGGCUUAAAGCAGUGGG	1398
GGGACUUUCCGUCUGGGGAC	661	GGGACUUUCCGUCUGGGGAC	661	GUCCCCCAGCGAAAGUCCC	1399
AUCACCUAGAACUUUAAU	662	AUCACCUAGAACUUUAAU	662	AUUUAAAGGUUCUAGGUGAU	1400
UAGAGCCUGGAAGCAUCC	663	UAGAGCCUGGAAGCAUCC	663	GGAUGCUUCCAGGGCUCUA	1401
GGGCUUGUGGAAUUGUGGA	664	GGGCUUGUGGAAUUGUGGA	664	UCCACAUUUUCAAACAGCC	1402
UUUCAGCAUUUACAGAAGG	665	UUUCAGCAUUUACAGAAGG	665	CCUUCUGAUAAUGCUGAAA	1403
UGACCCAUCAAAAGACUUA	666	UGACCCAUCAAAAGACUUA	666	UAAGUCUUUUUGAUGGGUAC	1404
AGAAAAAUAAAAGCAUUA	667	AGAAAAAUAAAAGCAUUA	667	UAAUGCUUUUUUUUUUUCU	1405
AGAAGCGGAGACAGCGACG	668	AGAAGCGGAGACAGCGACG	668	CGUCGUCUGUCUCCGCUUCU	1406
AAGAAAAAUAAAAGCAUUA	669	AAGAAAAAUAAAAGCAUUA	669	AAUGCUUUUUUUUUUUUUCU	1407
AAUGGAGAAAAUUAAGUAGA	670	AAUGGAGAAAAUUAAGUAGA	670	UCUACUAAUUUUUCCUCAAU	1408
GCUGAACAUUUUAGACAG	671	GCUGAACAUUUUAGACAG	671	CUGUCUUAAGAUGUUCAGC	1409
AAAAAGAAAAAUACAGUAA	672	AAAAAGAAAAAUACAGUAA	672	UUACUGAUUUUUUUCUUUUU	1410
GAACAAGCCCCAGAAAGCC	673	GAACAAGCCCCAGAAAGCC	673	GGUCUUCUGGGGCUUGUUC	1411
GUGAUAAUUGUCAGCUAAA	674	GUGAUAAUUGUCAGCUAAA	674	UUUAGCUGACAUUUUACAC	1412
GAGCCUGGGAAGCAUCCAG	675	GAGCCUGGGAAGCAUCCAG	675	CUGGAUGCUUCCAGGGCUC	1413
AGUGGGGGGACAUCAAGCA	676	AGUGGGGGGACAUCAAGCA	676	UGCUUGAUGUCCGCCACACU	1414
GCCUGGGAGCUCUCUGGCU	677	GCCUGGGAGCUCUCUGGCU	677	AGCCAGAGAGCUCGCCAGGC	1415
UGGAAAGGACCAGCAAAGC	678	UGGAAAGGACCAGCAAAGC	678	GCUUUGCUGGUCUUUCCA	1416

AGCAGGACAUAAACAGGUA	679	AGCAGGACAUAAACAGGUA	679	UACCUUGUUAUGUCCUGCU	1417
CCUAGAACUUUAAUUGCAU	680	CCUAGAACUUUAAUUGCAU	680	AUGCAUUUAAAGUUCUAGG	1418
AGUAGAUAAUUAAGUCAGU	681	AGUAGAUAAUUAAGUCAGU	681	ACUGACUAAUUUAUCUACU	1419
AAAUUAAAGCCAGGAAUUGG	682	AAAUUAAAGCCAGGAAUUGG	682	CCAUUCUCCGCUUUAAUUU	1420
AGUAAAAUAAAGCCAGGA	683	AGUAAAAUAAAGCCAGGA	683	UCCUGGCUUAAUUUUUACU	1421
UGUGAUAAUUGUCAGCUAA	684	UGUGAUAAUUGUCAGCUAA	684	UUAGCUGACAUUUUACACA	1422
AGCCUGGAAGCAUCCAGG	685	AGCCUGGAAGCAUCCAGG	685	CCUGGAUGCUUCCAGGGCU	1423
CACUGCUUAAAGCCUCAUA	686	CACUGCUUAAAGCCUCAUA	686	UAUUUAGGCUUAAAGCAGUG	1424
AAAAAUACAGUAAACAGUAC	687	AAAAAUACAGUAAACAGUAC	687	GUACUGUUAUGAUUUUUU	1425
GAGCCUGGGAGCUCUCUGG	688	GAGCCUGGGAGCUCUCUGG	688	CCAGAGAGCUCUCCAGGCUC	1426
UUCGCGUGGGGACUUUCCA	689	UUCGCGUGGGGACUUUCCA	689	UGGAAAGUCCCCAGCGGAA	1427
GAGAGACAGGCUAAUUUUU	690	GAGAGACAGGCUAAUUUUU	690	AAAAUUUAGCCUGUCUCUC	1428
GCUGUGAUAAUUGUCAGCU	691	GCUGUGAUAAUUGUCAGCU	691	AGCUGACAUUUUACACAGC	1429
CCACAGACCCCAACCCACA	692	CCACAGACCCCAACCCACA	692	UGUGGGUUGGGGUCUGUGG	1430
CAGGAAGAAAGCGGAGACAG	693	CAGGAAGAAAGCGGAGACAG	693	CUGUCUCCGCUUCUCCUG	1431
UAAAGCCUCAUAAAGCUUG	694	UAAAGCCUCAUAAAGCUUG	694	CAAGCUUUUUAUUGAGGCUA	1432
UAAAAAGAAAAAUACAGU	695	UAAAAAGAAAAAUACAGU	695	ACUGAUUUUUUUCUUUUUA	1433
GACAGAAAGAAAAUAAAA	696	GACAGAAAGAAAAUAAAA	696	UUUUUUUUUUUUCUUCUGC	1434
GUACCAUAAAUUAAAGC	697	GUACCAUAAAUUAAAGC	697	GCUUUAAUUUUAUCUGUAC	1435
AAAAGAAAAAUACAGUAA	698	AAAAGAAAAAUACAGUAA	698	GUUACUGAUUUUUUUCUUU	1436
AAAAAUACAGUAAACAGUACU	699	AAAAAUACAGUAAACAGUACU	699	AGUACUGUUAACUGAUUUU	1437
AGAGCCUGGAAGCAUCCA	700	AGAGCCUGGAAGCAUCCA	700	UGGAUGCUUCCAGGGCUCU	1438
CAGGGGCAAUUGGUACAUC	701	CAGGGGCAAUUGGUACAUC	701	GAUGUACCAUUUGCCCUUG	1439
CUGCAUUUACCAUACCUAG	702	CUGCAUUUACCAUACCUAG	702	CUAGGUUUGGUAAUUGCAG	1440
UAAAUUGCAUGGGUAAAAGU	703	UAAAUUGCAUGGGUAAAAGU	703	ACUUUUUACCCAUUGCAUUU	1441
AAGUAAACAUAGUAAACAGA	704	AAGUAAACAUAGUAAACAGA	704	UCUGUUAUUAUGUUAUACU	1442
CCACACAUUGCCUGUGUACC	705	CCACACAUUGCCUGUGUACC	705	GGUACACAGGCAUGUGUGG	1443
AGUAGAUUUACAGAGAACUU	706	AGUAGAUUUACAGAGAACUU	706	AAGUUCUUCUGAAAUUCUACU	1444
CAUCAGAAAGAACCUCCA	707	CAUCAGAAAGAACCUCCA	707	AUGGAGGUUCUUUCUGAUG	1445
ACCAGUAAAAUAAAGCCA	708	ACCAGUAAAAUAAAGCCA	708	UGGCUUUAAUUUUUACUGU	1446
CACAGACCCCAACCCACA	709	CACAGACCCCAACCCACA	709	UUGUGGGUUGGGGUCUGUG	1447
AGGGGGGAUUGGGGGGUAC	710	AGGGGGGAUUGGGGGGUAC	710	GUACCCCAUUAUCCCCCU	1448
UGCAUUUACCAUACCUAGU	711	UGCAUUUACCAUACCUAGU	711	ACUAGGUUAGGUAAUUGCA	1449
CAUUGGACAUCAAAUUU	712	CAUUGGACAUCAAAUUU	712	AAAUUUGAUUUGUCCAUUG	1450
CUGAACAUUUUAGACAGC	713	CUGAACAUUUUAGACAGC	713	GCUGUCUUUAGAUUUCAG	1451
GCCUCAUAAAGCUUGCCU	714	GCCUCAUAAAGCUUGCCU	714	AGGCAAGCUUUUUAUGAGC	1452

UGUACCCACAGACCCCAAC	715	UGUACCCACAGACCCCAAC	715	GUUGGGGUCUGUGGGUACA	1453
GAAGUAAACAUAGUACAG	716	GAAGUAAACAUAGUACAG	716	CUGUUAACUAGUUUACUUC	1454
GUAGGACCUACACCCUGUA	717	GUAGGACCUACACCCUGUA	717	UGACAGGUGUAGGUCCUAC	1455
CAGUGGGGGGACAUCAAGC	718	CAGUGGGGGGACAUCAAGC	718	GCUUGAUUGUCCGCCACUG	1456
ACCCACUUCUUAAGCCUCA	719	ACCCACUUCUUAAGCCUCA	719	UGAGGCUUAAGCAGUGGGU	1457
AAAAUUUGGGCCUGAAAAU	720	AAAAUUUGGGCCUGAAAAU	720	AUUUUCAGGCCCAUUUUU	1458
UGGGGGGACAUCAAGCAGC	721	UGGGGGGACAUCAAGCAGC	721	GCUGCUUGAUUGCCCCCA	1459
GUACAAUUGGCAGUAUUA	722	GUACAAUUGGCAGUAUUA	722	UGAAUACUGCCAUUUUAC	1460
AAGCUAUAGGUACAGUAUU	723	AAGCUAUAGGUACAGUAUU	723	AAUACUGUACCUAUAGCUU	1461
CAGAAGAAAAUAAAAGC	724	CAGAAGAAAAUAAAAGC	724	GCUUUUUUUUUUUUUUCUG	1462
AAUUGCAUGGGUAAAAGUA	725	AAUUGCAUGGGUAAAAGUA	725	UACUUUUUACCCAUUUU	1463
AGCCUCAUUAAGCUUGCC	726	AGCCUCAUUAAGCUUGCC	726	GGCAAGCUUUUUUAGGCU	1464
CCACUGCUUAAGCCUAAU	727	CCACUGCUUAAGCCUAAU	727	AUUGAGGCUUAAGCAGUGG	1465
AAGAAGCGGAGACAGCGAC	728	AAGAAGCGGAGACAGCGAC	728	GUCGCUUGUCCCGCUUUU	1466
AAUUGGAGAAAAUUAAGUA	729	AAUUGGAGAAAAUUAAGUA	729	CUACUAAUUUUCUCCAUUU	1467
AGCCUGGGAGCUCUCUGGC	730	AGCCUGGGAGCUCUCUGGC	730	GCCAGAGAGCUCUCCAGGCU	1468
AACAAGCCCCAGAAAGCCA	731	AACAAGCCCCAGAAAGCCA	731	UGGUCUUCUGGGGCUUUU	1469
UACCAGUAAAAUUAAGCC	732	UACCAGUAAAAUUAAGCC	732	GGCUUUUUUUUUUACUGGUA	1470
UUCAAAAAUUGGGCCUGAA	733	UUCAAAAAUUGGGCCUGAA	733	UUCAGGCCCAUUUUUUGAA	1471
AGAAGAAAAUUAAGGCA	734	AGAAGAAAAUUAAGGCA	734	UGCUUUUUUUUUUUUCUUCU	1472
CUGUGUACCCACAGACCCC	735	CUGUGUACCCACAGACCCC	735	GGGCGUCUGGGGUACACAG	1473
GCCUGUACUGGGUCUCUCU	736	GCCUGUACUGGGUCUCUCU	736	AGAGAGACCCAGUACAGGC	1474
CAGUAAAAUUAAGCCAGG	737	CAGUAAAAUUAAGCCAGG	737	CCUGGGCUUUUUUUUACUG	1475
UACAAUUGGCAGUAUUAU	738	UACAAUUGGCAGUAUUAU	738	AUGAAUACUGCCAUUUUGA	1476

siRNAコンストラクトの上側配列および下側配列の3'末端は、例えば、約1, 2, 3, または4ヌクレオチドの長さ、好ましくは2ヌクレオチドの長さのオーバーハング配列を含むことができ、下側配列のオーバーハング配列は任意に標的配列の一部と相補的であってもよい。上側配列はセンス鎖とも称され、下側配列はアンチセンス鎖とも称される。表中の上側配列および下側配列は、さらに式I-VIIまたはそれらの任意の組み合わせを有する化学修飾を含むことができる。

表 III: HIV 合成修飾 siRNA コンストラクト

標的 位置	標的	配列 番号	RPI 番号	別名	配列	配列 番号
1399	ACCAUCAUUGAGGAAGCUG	36		HIV43:1399U21 siRNA sense	ACCAUCAUUGAGGAAGCUGTT	1483
2323	UAGAUACAGGAGCAGAUUA	8		HIV43:2323U21 siRNA sense	UAGAUACAGGAGCAGAUATT	1484
2328	ACAGGAGCAGAUUAACAG	5		HIV43:2328U21 siRNA sense	ACAGGAGCAGAUUAACAGTT	1485
4930	UUUGGAAAGGACCAAGCAA	1		HIV43:4930U21 siRNA sense	UUUGGAAAGGACCAAGCAATT	1486
5077	GUAGACAGGAUAGGAUUA	4		HIV43:5077U21 siRNA sense	GUAGACAGGAUAGGAUUAATT	1487
5955	CUUAGGCAUCCCUAUGGC	99		HIV43:5955U21 siRNA sense	CUUAGGCAUCCCUAUGGCTT	1488
5982	GCGGAGACAGCGACGAAGA	1477		HIV43:5982U21 siRNA sense	GCGGAGACAGCGACGAAGATT	1489
8499	GCCUGUGCCCUUUCAGCUA	1478		HIV43:8499U21 siRNA sense	GCCUGUGCCCUUUCAGCUATT	1490
1399	ACCAUCAUUGAGGAAGCUG	36		HIV43:1417L21 siRNA (1399C) antisense	CAGCUUCCCUAUAUAGGUTT	1491
2323	UAGAUACAGGAGCAGAUUA	8		HIV43:2341L21 siRNA (2323C) antisense	UACUUCUGCCUUGUAUUAATT	1492
2328	ACAGGAGCAGAUUAACAG	5		HIV43:2346L21 siRNA (2328C) antisense	CUGUAUUAUCCUCCUUGUTT	1493
4930	UUUGGAAAGGACCAAGCAA	1		HIV43:4948L21 siRNA (4930C) antisense	UUUGCUGGUCUUAUCCAAATT	1494
5077	GUAGACAGGAUAGGAUUA	4		HIV43:5095L21 siRNA (5077C) antisense	UAAUCCUUAUCCUUAUUAATT	1495
5955	CUUAGGCAUCCCUAUGGC	99		HIV43:5973L21 siRNA (5955C) antisense	GCCAUAGGAGAUUCCUUAAGTT	1496
5982	GCGGAGACAGCGACGAAGA	1477		HIV43:6000L21 siRNA (5982C) antisense	UCCUUCGUCGUCUCCGCTT	1497
8499	GCCUGUGCCCUUUCAGCUA	1478		HIV43:8517L21 siRNA (8499C) antisense	UAGCUGAAGAGGCACAGGCTT	1498
1399	ACCAUCAUUGAGGAAGCUG	36		HIV43:1399U21 siRNA stab04 sense	B AccAucAAUAGGGAAGGcUATT B	1499
2323	UAGAUACAGGAGCAGAUUA	8		HIV43:2323U21 siRNA stab04 sense	B uAGAUuAcAGGAGcAGAUATT B	1500
2328	ACAGGAGCAGAUUAACAG	5		HIV43:2328U21 siRNA stab04 sense	B AcAGGAGcAGAUuAGcAATT B	1501
4930	UUUGGAAAGGACCAAGCAA	1		HIV43:4930U21 siRNA stab04 sense	B uuUGGAAAGGAGAcAGcAAATT B	1502
5077	GUAGACAGGAUAGGAUUA	4		HIV43:5077U21 siRNA stab04 sense	B GuAGAcAGGAGuAGGAGuATT B	1503
5955	CUUAGGCAUCCCUAUGGC	99		HIV43:5955U21 siRNA stab04 sense	B cuuAGGcAUucccuAuGGcTT B	1504
5982	GCGGAGACAGCGACGAAGA	1477		HIV43:5982U21 siRNA stab04 sense	B GcGAGAGAcAGcGcAGGATT B	1505
8499	GCCUGUGCCCUUUCAGCUA	1478		HIV43:8499U21 siRNA stab04 sense	B GccuGuGcccuuucAGcUATT B	1506
1399	ACCAUCAUUGAGGAAGCUG	36		HIV43:1417L21 siRNA (1399C) stab05 antisense	cAGcuuuccuAuUGAuGcUATT B	1507
2323	UAGAUACAGGAGCAGAUUA	8		HIV43:2341L21 siRNA (2323C) stab05 antisense	uAucuuGcuuAuGuUAATsT	1508
2328	ACAGGAGCAGAUUAACAG	5		HIV43:2346L21 siRNA (2328C) stab05 antisense	cuGuAuAuAuGcuccuGuTsT	1509
4930	UUUGGAAAGGACCAAGCAA	1		HIV43:4948L21 siRNA (4930C) stab05 antisense	uuuGcuGuccuuuucAAATsT	1510
5077	GUAGACAGGAUAGGAUUA	4		HIV43:5095L21 siRNA (5077C) stab05 antisense	uAAuccuAuuccuAuGcTsT	1511
5955	CUUAGGCAUCCCUAUGGC	99		HIV43:5973L21 siRNA (5955C) stab05 antisense	GccAuAGGAGAuGccuAAGTsT	1512
5982	GCGGAGACAGCGACGAAGA	1477	31238	HIV43:6000L21 siRNA (5982C) stab05 antisense	uccuGcGcGcGcGcGcTsT	1513
8499	GCCUGUGCCCUUUCAGCUA	1478	31237	HIV43:8517L21 siRNA (8499C) stab05 antisense	uAGcuGAAGAGGcAcAGGcTsT	1514
1399	ACCAUCAUUGAGGAAGCUG	36		HIV43:1399U21 siRNA stab07 sense	B AccAucAAUAGGGAAGGcUATT B	1515

2323	UAGAUACAGGAGCAGAUGA	8		HIV43:2323U21 siRNA stab07 sense	B uAGAUAcAGGAGcAGAU GATT B	1516
2328	ACAGGAGCAGAUGAUACAG	5		HIV43:2328U21 siRNA stab07 sense	B AcAGGAGcAGAU GAcAGTT B	1517
4930	UUUGGAAAGGACCAGCAAA	1		HIV43:4930U21 siRNA stab07 sense	B uuUGGAAAGGAccAGcAAATT B	1518
5077	GUAGACAGGAUGAGGAUUA	4		HIV43:5077U21 siRNA stab07 sense	B GuAGAcAGGAUGAGGAuUATT B	1519
5955	CUUAGGCAUCUCCUAUGGC	99		HIV43:5955U21 siRNA stab07 sense	B cuuAGGcAuucuccuAuGcTT B	1520
5982	GCGGAGACAGCGACGAAGA	1477		HIV43:5982U21 siRNA stab07 sense	B GcGAGAcAGcGAcGAAGATT B	1521
8499	GCCUGUGCCUCUUCAGCUA	1478		HIV43:8499U21 siRNA stab07 sense	B GccuGuGccuuccuAGcUATT B	1522
1399	ACCAUCAUAGAGGAAGCUG	36		HIV43:1417L21 siRNA (1399C) stab11 antisense	cAGcuuccuAuU GAcGUATsT	1523
2323	UAGAUACAGGAGCAGAUGA	8		HIV43:2341L21 siRNA (2323C) stab11 antisense	ucAuccuGuccuGuAUcUATsT	1524
2328	ACAGGAGCAGAUGAUACAG	5		HIV43:2348L21 siRNA (2328C) stab11 antisense	cuGuAucAuccuGuccuGuATsT	1525
4930	UUUGGAAAGGACCAGCAAA	1		HIV43:4948L21 siRNA (4930C) stab11 antisense	uuuGcuGuccuuccAAATsT	1526
5077	GUAGACAGGAUGAGGAUUA	4		HIV43:5095L21 siRNA (5077C) stab11 antisense	uAUuccuAcuccuGuUcUATsT	1527
5955	CUUAGGCAUCUCCUAUGGC	99		HIV43:5973L21 siRNA (5955C) stab11 antisense	GccAuAGGAGAU GccuAAGTsT	1528
5982	GCGGAGACAGCGACGAAGA	1477	31240	HIV43:8000L21 siRNA (5982C) stab11 antisense	ucuuuGucGcuGucccGcTsT	1529
8499	GCCUGUGCCUCUUCAGCUA	1478	31241	HIV43:8517L21 siRNA (8499C) stab11 antisense	uAGcuGAAGAGGcAcAGGcTsT	1530
	AGGGGAAGUGACAUAGCAGGAAC	1479	30793	HIV:1484U21 siRNA stab04 sense	B GGGAAUGcAcAUAGcAGGATT B	1531
	CAGAGAUUGAAAGGAAGGAAA	1480	30794	HIV:2668U21 siRNA stab04 sense	B GAGAUUGGAAAGGAAGGATT B	1532
	CUUGGAGGAGGAGAUUAGGGGA	1481	30795	HIV:7633U21 siRNA stab04 sense	B uGGAGGAGGAGAUuAGGATT B	1533
	CUGGAAAAACAUGGACCAUAC	1482	30796	HIV:8908U21 siRNA stab04 sense	B GGA AAAAGcAGGcAAuCTT B	1534
	AGGGGAAGUGACAUAGCAGGAAC	1479	30797	HIV:1502L21 siRNA (1484C) stab05 antisense	uccuGcuAuGcAcuuccGcTsT	1535
	CAGAGAUUGAAAGGAAGGAAA	1480	30798	HIV:2684L21 siRNA (2666C) stab05 antisense	uccuuccuuccuuccuuccuTsT	1536
	CUUGGAGGAGGAGAUUAGGGGA	1481	30799	HIV:7651L21 siRNA (7633C) stab05 antisense	ccuucAuAuccuuccuuccATsT	1537
	CUGGAAAAACAUGGACCAUAC	1482	30800	HIV:8924L21 siRNA (8908C) stab05 antisense	GAuuGcuuccAuGuuuuuccTsT	1538
	ACCAUCAUAGAGGAAGCUG	36	31218	HIV43:1399U21 siRNA stab09 sense	B CAGCUUCCUCAUUGAUUGUTT B	1539
	UAGAUACAGGAGCAGAUGA	8	31219	HIV43:2323U21 siRNA stab09 sense	B UCAUCUGCUCUGUAUCUATT B	1540
	ACAGGAGCAGAUGAUACAG	5	31220	HIV43:2328U21 siRNA stab09 sense	B CUGUAUCAUCUGCUCUGUTT B	1541
	UUUGGAAAGGACCAGCAAA	1	31221	HIV43:4930U21 siRNA stab09 sense	B UUUGCUGGUCUUCUCAAATT B	1542
	GUAGACAGGAUGAGGAUUA	4	31222	HIV43:5077U21 siRNA stab09 sense	B UAUUCCUCAUCCUGCUUACTT B	1543
	CUUAGGCAUCUCCUAUGGC	99	31223	HIV43:5955U21 siRNA stab09 sense	B GCCAUAGGAGAUCCUAAATT B	1544
	GCGGAGACAGCGACGAAGA	1477	31224	HIV43:5982U21 siRNA stab09 sense	B UCUUCUGCUGCUGUCUCCGCTT B	1545
	GCCUGUGCCUCUUCAGCUA	1478	31225	HIV43:8499U21 siRNA stab09 sense	B UAGCUAGAGGACGACAGGCTT B	1546
	ACCAUCAUAGAGGAAGCUG	36	31226	HIV43:1417L21 siRNA (1399C) stab10 antisense	CAGCUUCCUCAUUGAUUGUTT B	1547
	UAGAUACAGGAGCAGAUGA	8	31227	HIV43:2341L21 siRNA (2323C) stab10 antisense	UCAUCUGCUCUGUAUCUATsT	1548
	ACAGGAGCAGAUGAUACAG	5	31228	HIV43:2346L21 siRNA (2328C) stab10 antisense	CUGUAUCAUCUGCUCUGUTT B	1549
	UUUGGAAAGGACCAGCAAA	1	31229	HIV43:4948L21 siRNA (4930C) stab10 antisense	UUUGCUGGUCUUCUCAAATT B	1550
	GUAGACAGGAUGAGGAUUA	4	31230	HIV43:5095L21 siRNA (5077C) stab10 antisense	UAUCCUCAUCCUGCUUACTsT	1551
	CUUAGGCAUCUCCUAUGGC	99	31231	HIV43:5973L21 siRNA (5955C) stab10 antisense	GCCAUAGGAGAUCCUUAAGTsT	1552
	GCGGAGACAGCGACGAAGA	1477	31232	HIV43:8000L21 siRNA (5982C) stab10 antisense	UCUUCUGCUGCUGUCUCCGCTsT	1553

【表3.0】

(115)

JP 2006-502694 A 2006.1.26

	GCCUGUGCCUCUUCAGCUA	1478	31233	HIV43:8517L21 siRNA (8499C) stab10 antisense	UAGCUGAAGAGGACAGGCTsT	1554
	GCGGAGACAGCGACGAAGA	1477	31234	HIV43:5982U21 siRNA stab04 sense	B uccuucGucGcuGucccGcTT B	1555
	GCCUGUGCCUCUUCAGCUA	1478	31235	HIV43:8499U21 siRNA stab04 sense	B uAGcUGAAGAGGcAcAGGcTT B	1556
	GCGGAGACAGCGACGAAGA	1477	31238	HIV43:5982U21 siRNA stab07 antisense	B uccuucGucGcuGucccGcTT B	1557
	GCCUGUGCCUCUUCAGCUA	1478	31239	HIV43:8499U21 siRNA stab07 antisense	B uAGcUGAAGAGGcAcAGGcTT B	1558
	ACCAUCAUAGAGGAAGCUG	36	31242	HIV43:1399U21 siRNA inv stab09 sense	B GUCGAAGGAGUAACUACATT B	1559
	UAGAUACAGGAGCAGAUGA	8	31243	HIV43:2323U21 siRNA inv stab09 sense	B AGUAGACGAGGACAUUAGUATT B	1560
	ACAGGAGCAGAUGAUACAG	5	31244	HIV43:2328U21 siRNA inv stab09 sense	B GACAUAGUAGACGAGGACATT B	1561
	UUUGGAAAGGACCAGCAAA	1	31245	HIV43:4930U21 siRNA inv stab09 sense	B AAACGACGAGGAAAGGUUUTT B	1562
	GUAGACAGGAUGAGGAUUA	4	31246	HIV43:5077U21 siRNA inv stab09 sense	B AUUAGGAGUAGGACAGUATT B	1563
	CUUAGGCAUCUCCUAUGGC	99	31247	HIV43:5955U21 siRNA inv stab09 sense	B CGGUAUCCUCUACGGAUUUTT B	1564
	GCGGAGACAGCGACGAAGA	1477	31248	HIV43:5982U21 siRNA inv stab09 sense	B AGAAGCAGCAGACAGAGGCTT B	1565
	GCCUGUGCCUCUUCAGCUA	1478	31249	HIV43:8499U21 siRNA inv stab09 sense	B AUCGACUUCUCCUGUCCGTT B	1566
	ACCAUCAUAGAGGAAGCUG	36	31250	HIV43:1417L21 siRNA (1399C) inv stab10 antisense	UGUAUUAUCCUUCUCCGACTsT	1567
	UAGAUACAGGAGCAGAUGA	8	31251	HIV43:2341L21 siRNA (2323C) inv stab10 antisense	AUCUAUQUCCUCCUUCUATsT	1568
	ACAGGAGCAGAUGAUACAG	5	31252	HIV43:2346L21 siRNA (2328C) inv stab10 antisense	UGUCCUCCUCCUACUAGUCTsT	1569
	UUUGGAAAGGACCAGCAAA	1	31253	HIV43:4948L21 siRNA (4930C) inv stab10 antisense	AAACCUUCCUCCUGUCUUAUTT B	1570
	GUAGACAGGAUGAGGAUUA	4	31254	HIV43:5095L21 siRNA (5077C) inv stab10 antisense	CAUCUGUCCUACUCCUAAUUTsT	1571
	CUUAGGCAUCUCCUAUGGC	99	31255	HIV43:5973L21 siRNA (5955C) inv stab10 antisense	GAUCCUGUAGAGGAUACCGTsT	1572
	GCGGAGACAGCGACGAAGA	1477	31256	HIV43:6000L21 siRNA (5982C) inv stab10 antisense	CGCCUCUGCGCUGCUUUCUUTsT	1573
	GCCUGUGCCUCUUCAGCUA	1478	31257	HIV43:8517L21 siRNA (8499C) inv stab10 antisense	CGGACACGAGGAAGUCGATT B	1574
	GCGGAGACAGCGACGAAGA	1477	31258	HIV43:5982U21 siRNA inv stab04 sense	B AGAAGcAGcAcAGAGGcGTT B	1575
	GCCUGUGCCUCUUCAGCUA	1478	31259	HIV43:8499U21 siRNA inv stab04 sense	B AucGAcuuccuGuGuccGTT B	1576
	GCGGAGACAGCGACGAAGA	1477	31260	HIV43:6000L21 siRNA (5982C) inv stab05 antisense	cGccuucGucGcuGuccuTsT	1577
	GCCUGUGCCUCUUCAGCUA	1478	31261	HIV43:8517L21 siRNA (8499C) inv stab05 antisense	cGGAcAcGGAGAAuGcGUATsT	1578
	GCGGAGACAGCGACGAAGA	1477	31262	HIV43:5982U21 siRNA inv stab07 sense	B AGAAGcAGcAcAGAGGcGTT B	1579
	GCCUGUGCCUCUUCAGCUA	1478	31263	HIV43:8499U21 siRNA inv stab07 sense	B AucGAcuuccuGuGuccGTT B	1580
	GCGGAGACAGCGACGAAGA	1477	31264	HIV43:6000L21 siRNA (5982C) inv stab11 antisense	cGccuucGucGcuGuccuTsT	1581
	GCCUGUGCCUCUUCAGCUA	1478	31265	HIV43:8517L21 siRNA (8499C) inv stab11 antisense	cGGAcAcGGAGAAuGcGUATsT	1582

【表3.1】

(116)

JP 2006-502694 A 2006.1.26

大文字 = リボヌクレオチド

u,c = 2'-デオキシ-2'-フルオロ U,C

T = チミン

B = 反転デオキシ無塩基

s = ホスホロチオエート結合

A = デオキシアデニン

G = デオキシグアニン

【表 3 2】

(117)

表IV
化学的に修飾されたsiNA構築物用の安定化化学の非限定的例

化学	ピリミジン	プリン	キャップ	p=S	鎖
"Stab1"	リボ	リボ	—	5'末端に5 3'末端に1	S/AS
"Stab2"	リボ	リボ	—	全結合	通常はAS
"Stab3"	2'-フルオロ	リボ	—	5'末端に4 3'末端に4	通常はS
"Stab4"	2'-フルオロ	リボ	5'および3'末端	—	通常はS
"Stab5"	2'-フルオロ	リボ	—	3'末端に1	通常はAS
"Stab6"	2'-O-メチル	リボ	5'および3'末端	—	通常はS
"Stab7"	2'-フルオロ	2'-デオキシ	5'および3'末端	—	通常はS
"Stab8"	2'-フルオロ	2'-O-メチル	—	3'末端に1	通常はAS
"Stab9"	リボ	リボ	5'および3'末端	—	通常はS
"Stab10"	リボ	リボ	—	3'末端に1	通常はAS
"Stab11"	2'-フルオロ	2'-デオキシ	—	3'末端に1	通常はAS

Cap = 任意の末端キャップ, 例えば, 図 10 を参照。

Stab 1-11 化学はすべて 3'-末端チミン(TT) 残基を含むことができる。

Stab 1-11 化学はすべて、典型的には 21ヌクレオチドを含むが、本明細書に記載されるようにこれはさまざまであり得る。

S = センス鎖

AS = アンチセンス鎖

【表 3 3】

表V

(118)

JP 2006-502694 A 2006.1.26

A. 2.5 μ mol 合成サイクル ABI 394 装置

試薬	当量	量	待機時間 DNA	待機時間 2'-O-メチル	待機時間 RNA
ホスホルグミダイト	6.5	168 μ L	45 sec	2.5 min	7.5 min
5'-エチルチトシール	23.8	238 μ L	45 sec	2.5 min	7.5 min
無水酢酸	100	233 μ L	5 sec	5 sec	5 sec
ルチル/ミダニール	188	233 μ L	5 sec	5 sec	5 sec
TCA	176	2.3 mL	21 sec	21 sec	21 sec
ヨウ素	112	1.7 mL	45 sec	45 sec	45 sec
ボーラーズ	12.9	645 μ L	100 sec	300 sec	300 sec
アセトニトリル	NA	6.67 mL	NA	NA	NA

B. 0.2 μ mol 合成サイクル ABI 394 装置

試薬	当量	量	待機時間 DNA	待機時間 2'-O-メチル	待機時間 RNA
ホスホルグミダイト	16	31 μ L	45 sec	233 sec	465 sec
5'-エチルチトシール	38.7	31 μ L	45 sec	233 min	465 sec
無水酢酸	655	124 μ L	5 sec	5 sec	5 sec
ルチル/ミダニール	1245	124 μ L	5 sec	5 sec	5 sec
TCA	700	732 μ L	10 sec	10 sec	10 sec
ヨウ素	20.6	244 μ L	15 sec	15 sec	15 sec
ボーラーズ	7.7	232 μ L	100 sec	300 sec	300 sec
アセトニトリル	NA	2.64 mL	NA	NA	NA

C. 0.2 μ mol 合成サイクル 96 ウェル装置

試薬	当量 DNA 2'-O-メチル	量 DNA 2'-O-メチル	待機時間 DNA	待機時間 2'-O-メチル	待機時間 RNA
ホスホルグミダイト	2233/66	40/60/120 μ L	60 sec	180 sec	380 sec
5'-エチルチトシール	70/105/210	40/60/120 μ L	60 sec	180 min	380 sec
無水酢酸	255/265/265	50/50/50 μ L	10 sec	10 sec	10 sec
ルチル/ミダニール	502/502/502	50/50/50 μ L	10 sec	10 sec	10 sec
TCA	238/475/475	250/500/500 μ L	15 sec	15 sec	15 sec
ヨウ素	6.8/6.8/6.8	80/80/80 μ L	30 sec	30 sec	30 sec
ボーラーズ	345/151	80/120/120	100 sec	200 sec	200 sec
アセトニトリル	NA	1150/1150/1150 μ L	NA	NA	NA

- 待機時間は輸送の間の接触時間を含まない
- マルチム合成にはリンカー分子のダブルカンパリングを利用する

【図面の簡単な説明】

【0384】

【図1】図1は、siNA分子を合成するスキームの例を示す。

【図2】図2は、本発明の方法により合成された精製 siNA デュープレックスの MALDI-TOF 質量分析を示す。

【図3】図3は、RNAiに關与する標的 RNA 分解の提唱されるメカニズムの例を示す

ॐ नमः शिवाय ॥

【図4】図4は、化学的に修飾されたs i N Aコンストラクトの例を示す。

【図5】図5は、化学的に修飾された特定のs i n A配列の例を示す。

【図6】図6は、種々s i N Aコンストラクトの例を示す。

【図7】図7は、s i n Aへアビコンストラクトを生成するための発現カセットを作成するために用いられるスキームの概略図である。

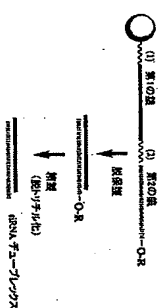
【図8】図8は、発現カセットを作製して二本鎖sINAコンストラクトを生成するために用いられるスキームの概略図である。

【図9】図9は、特定の標的核酸配列を決定するために用いられる方法の概略図である。

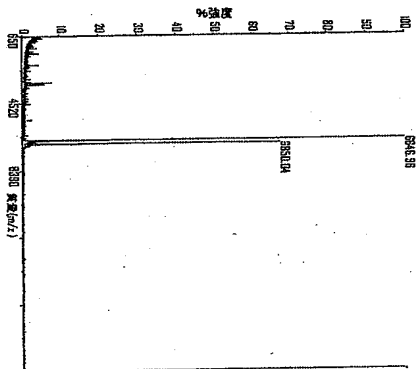
【図10】図10は、s i n A配列の3 木端を安定化させるために用いることかできる種々の安定化化学の例を示す。

【図111】図111は、化学的に修飾されたs1NAコンストラクトを同定するために用いられる戦略の例を示す。

【図1】



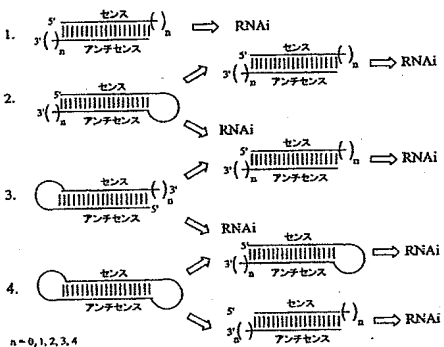
【図2】



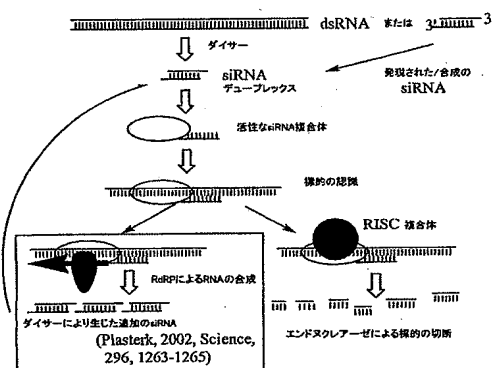
【DE 5】

	A	B	C	D	E	F
1.	5.	5.	5.	5.	5.	5.
2.	3.	3.	3.	3.	3.	3.
3.	1.	1.	1.	1.	1.	1.
4.	4.	4.	4.	4.	4.	4.
5.	2.	2.	2.	2.	2.	2.
6.	6.	6.	6.	6.	6.	6.
7.	7.	7.	7.	7.	7.	7.
8.	8.	8.	8.	8.	8.	8.
9.	9.	9.	9.	9.	9.	9.
10.	10.	10.	10.	10.	10.	10.
11.	11.	11.	11.	11.	11.	11.
12.	12.	12.	12.	12.	12.	12.
13.	13.	13.	13.	13.	13.	13.
14.	14.	14.	14.	14.	14.	14.
15.	15.	15.	15.	15.	15.	15.
16.	16.	16.	16.	16.	16.	16.
17.	17.	17.	17.	17.	17.	17.
18.	18.	18.	18.	18.	18.	18.
19.	19.	19.	19.	19.	19.	19.
20.	20.	20.	20.	20.	20.	20.
21.	21.	21.	21.	21.	21.	21.
22.	22.	22.	22.	22.	22.	22.
23.	23.	23.	23.	23.	23.	23.
24.	24.	24.	24.	24.	24.	24.
25.	25.	25.	25.	25.	25.	25.
26.	26.	26.	26.	26.	26.	26.
27.	27.	27.	27.	27.	27.	27.
28.	28.	28.	28.	28.	28.	28.
29.	29.	29.	29.	29.	29.	29.
30.	30.	30.	30.	30.	30.	30.
31.	31.	31.	31.	31.	31.	31.
32.	32.	32.	32.	32.	32.	32.
33.	33.	33.	33.	33.	33.	33.
34.	34.	34.	34.	34.	34.	34.
35.	35.	35.	35.	35.	35.	35.
36.	36.	36.	36.	36.	36.	36.
37.	37.	37.	37.	37.	37.	37.
38.	38.	38.	38.	38.	38.	38.
39.	39.	39.	39.	39.	39.	39.
40.	40.	40.	40.	40.	40.	40.
41.	41.	41.	41.	41.	41.	41.
42.	42.	42.	42.	42.	42.	42.
43.	43.	43.	43.	43.	43.	43.
44.	44.	44.	44.	44.	44.	44.
45.	45.	45.	45.	45.	45.	45.
46.	46.	46.	46.	46.	46.	46.
47.	47.	47.	47.	47.	47.	47.
48.	48.	48.	48.	48.	48.	48.
49.	49.	49.	49.	49.	49.	49.
50.	50.	50.	50.	50.	50.	50.
51.	51.	51.	51.	51.	51.	51.
52.	52.	52.	52.	52.	52.	52.
53.	53.	53.	53.	53.	53.	53.
54.	54.	54.	54.	54.	54.	54.
55.	55.	55.	55.	55.	55.	55.
56.	56.	56.	56.	56.	56.	56.
57.	57.	57.	57.	57.	57.	57.
58.	58.	58.	58.	58.	58.	58.
59.	59.	59.	59.	59.	59.	59.
60.	60.	60.	60.	60.	60.	60.
61.	61.	61.	61.	61.	61.	61.
62.	62.	62.	62.	62.	62.	62.
63.	63.	63.	63.	63.	63.	63.
64.	64.	64.	64.	64.	64.	64.
65.	65.	65.	65.	65.	65.	65.

【附 6】



【図 3】



【図 4】

[illegible]

NAのヌクレオチド配列またはその一部に実質的に類似するヌクレオチド配列を含む、請求項1記載のs i n A分子。

【請求項5】

s i n A分子の各鎖は約19一約23ヌクレオチドを含み、各鎖は他方の鎖のヌクレオチドに相補的な少なくとも約19ヌクレオチドを含む、請求項4記載のs i n A分子。

【請求項6】

前記s i n A分子はH I V遺伝子のヌクレオチド配列またはその一部に相補的なヌクレオチド配列を含むアプテセンス領域を含み、前記s i n Aはさらにセンス領域を含み、前記センス領域は前記H I V遺伝子のヌクレオチド配列またはその一部に実質的に類似するヌクレオチド配列を含む、請求項1記載のs i n A分子。

【請求項7】

前記アプテセンス領域および前記センス領域は約19一約23ヌクレオチドを含み、前記アプテセンス領域はセンス領域のヌクレオチドに相補的な少なくとも約19ヌクレオチドを含む、請求項6記載のs i n A分子。

【請求項8】

前記s i n A分子はセンス領域およびアプテセンス領域を含み、前記アプテセンス領域はH I V遺伝子によりコードされるRNAのヌクレオチド配列またはその一部に相補的なヌクレオチド配列を含み、および前記センス領域は前記アプテセンス領域に相補的なヌクレオチド配列を含む、請求項1記載のs i n A分子。

【請求項9】

前記s i n A分子は2つの別々のオリゴヌクレオチドフラグメントから組み立てられており、一方のフラグメントは前記s i n A分子のセンス領域を含み、第2のフラグメントは前記s i n A分子のアプテセンス領域を含む、請求項6記載のs i n A分子。

【請求項10】

前記センス領域がリンカー分子を介してアプテセンス領域と連結されている、請求項6記載のs i n A分子。

【請求項11】

前記リンカー分子がヌクレオチドリンカーである、請求項10記載のs i n A分子。

【請求項12】

前記リンカー分子が非ヌクレオチドリンカーである、請求項10記載のs i n A分子。

【請求項13】

センス領域中のピリミジンヌクレオチドが2'-O-メチルピリミジンヌクレオチドである、請求項6記載のs i n A分子。

【請求項14】

センス領域中のプリンヌクレオチドが2'-デオキシプリンヌクレオチドである、請求項6記載のs i n A分子。

【請求項15】

センス領域中に存在するピリミジンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドである、請求項6記載のs i n A分子。

【請求項16】

前記センス領域を含むフラグメントは、前記センス領域を含むフラグメントの5'末端、3'末端、または5'末端および3'末端の両方に末端キヤップ成分を含む、請求項9記載のs i n A分子。

【請求項17】

前記末端キヤップ成分が反転デオキシ無塩基成分である、請求項16記載のs i n A分子。

【請求項18】

前記アプテセンス領域のピリミジンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドである、請求項6記載のs i n A分子。

【請求項19】

前記アプテセンス領域のプリンヌクレオチドが2'-O-メチルプリンヌクレオチドである、請求項6記載のs i n A分子。

【請求項20】

前記アプテセンス領域中に存在するプリンヌクレオチドが2'-デオキシ-プリンヌクレオチドを含む、請求項6記載のs i n A分子。

【請求項21】

前記アプテセンス領域が前記アプテセンス領域の3'末端にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む、請求項18記載のs i n A分子。

【請求項22】

前記アプテセンス領域が前記アプテセンス領域の3'末端にグリセリル修飾を含む、請求項6記載のs i n A分子。

【請求項23】

前記s i n A分子の2つのフラグメントのそれぞれが約21ヌクレオチドを含む、請求項9記載のs i n A分子。

【請求項24】

s i n A分子の各フラグメントの約19ヌクレオチドはs i n A分子の他方のフラグメントの相補的なヌクレオチドと塩基対形成しており、s i n A分子の各フラグメントの少なくとも2つの3'末端ヌクレオチドはs i n A分子の他方のフラグメントのヌクレオチドと塩基対形成していない、請求項23記載のs i n A分子。

【請求項25】

s i n A分子の各フラグメントの2つの3'末端ヌクレオチドのそれぞれが2'-デオキシ-2'-ピリミジンである、請求項24記載のs i n A分子。

【請求項26】

前記2'-デオキシ-2'-ピリミジンが2'-デオキシ-2'-ピリミジンである、請求項25記載のs i n A分子。

【請求項27】

s i n A分子の各フラグメントの約21ヌクレオチドすべてがs i n A分子の他方のフラグメントの相補的なヌクレオチドと塩基対形成している、請求項23記載のs i n A分子。

【請求項28】

アプテセンス領域の約19ヌクレオチドがH I V遺伝子によりコードされるRNAのヌクレオチド配列またはその一部と塩基対形成している、請求項23記載のs i n A分子。

【請求項29】

アプテセンス領域の約21ヌクレオチドがH I V遺伝子によりコードされるRNAのヌクレオチド配列またはその一部と塩基対形成している、請求項23記載のs i n A分子。

【請求項30】

前記アプテセンス領域を含むフラグメントの5'末端が任意にリン酸基を含む、請求項9記載のs i n A分子。

【請求項31】

薬学的に許容しうる担体または希釈剤中に請求項1記載のs i n A分子を含む組成物。

【請求項32】

H I V RNAがH I V-1 RNAを含む、請求項1記載のs i n A。

【請求項33】

前記s i n Aが、配列番号1-1604のいずれかを含む、請求項1記載のs i n A。

【請求項34】

請求項32記載のs i n Aを薬学的に許容しうる担体または希釈剤とともに含む組成物。

【請求項35】

請求項33記載のs i n Aを薬学的に許容しうる担体または希釈剤とともに含む組成物。

フロントページの続き

- (31) 優先権主張番号 10/157,580
(32) 優先日 平成14年5月29日(2002.5.29)
(33) 優先権主張国 米国(US)
(31) 優先権主張番号 60/386,782
(32) 優先日 平成14年6月6日(2002.6.6)
(33) 優先権主張国 米国(US)
(31) 優先権主張番号 60/398,036
(32) 優先日 平成14年7月23日(2002.7.23)
(33) 優先権主張国 米国(US)
(31) 優先権主張番号 10/225,023
(32) 優先日 平成14年8月21日(2002.8.21)
(33) 優先権主張国 米国(US)
(31) 優先権主張番号 60/406,784
(32) 優先日 平成14年8月29日(2002.8.29)
(33) 優先権主張国 米国(US)
(31) 優先権主張番号 60/408,378
(32) 優先日 平成14年9月5日(2002.9.5)
(33) 優先権主張国 米国(US)
(31) 優先権主張番号 60/409,293
(32) 優先日 平成14年9月9日(2002.9.9)
(33) 優先権主張国 米国(US)
(31) 優先権主張番号 60/440,129
(32) 優先日 平成15年1月15日(2003.1.15)
(33) 優先権主張国 米国(US)

- (81) 指定国 AP(GH, GN, KE, LS, MW, MZ, SD, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TN), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GR, GU, GT, HK, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MZ, NO, NZ, OM, PG, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

- (74) 代理人 100114465
弁護士 北野 健
(72) 発明者 マクスタイン, ジェームズ
アメリカ合衆国 80301 コロラド州 ボールドー, フランクリン ドライヴ 4866
(72) 発明者 ベーゼルマン, レオニド
アメリカ合衆国 80503 コロラド州 ロングモント, コルト ドライヴ 5530
(72) 発明者 メースジャク, デニス
アメリカ合衆国 80004 コロラド州 アールバ, ユニオン ストリート 6595
Fターム(参考) 48024 A01 A20 C41 C420 H417 H420
4C086 A401 A403 A404 E417 M401 M404 M414 Z433 Z555

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成18年3月30日(2006.3.30)

【公表番号】特表2006-502694(P2006-502694A)

【公表日】平成18年1月26日(2006.1.26)

【年通号数】公開・登録公報2006-004

【出願番号】特願2003-569153(P2003-569153)

【国際特許分類】

C12N 15/09 (2006.01)

A61K 31/7105 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

【F1】

C12N 15/00 ZNA A

A61K 31/7105

A61P 31/18

【手続補正書】

【提出日】平成18年2月8日(2006.2.8)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

RNA干渉(RNAi)によりヒト免疫不全ウイルス(HIV)RNAの切断を指示する化学的に合成された二本鎖短干渉核酸(sinA)分子であって、

a. 前記sinA分子の各鎖は18-27ヌクレオチドの長さであり、

b. 前記sinA分子のアンチセンス鎖は前記HIV RNAのヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含み；センス鎖はアンチセンス鎖に相補的であり；および

c. 前記sinA分子は、センス鎖の5'末端および/または3'末端およびアンチセンス鎖の3'末端に少なくとも1つの化学的に修飾されたヌクレオチドまたは非ヌクレオチドを含む、

ことを特徴とするsinA分子。

【請求項2】

前記sinA分子がリボヌクレオチドを含まない、請求項1記載のsinA分子。

【請求項3】

前記sinA分子が1またはそれ以上のリボヌクレオチドを含む、請求項1記載のsinA分子。

【請求項4】

前記化学的に修飾されたヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドを含む、請求項1記載のsinA分子。

【請求項5】

前記化学的に修飾されたヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドを含む、請求項1記載のsinA分子。

【請求項6】

前記化学的に修飾されたヌクレオチドが2'-オームチルヌクレオチドを含む、請求項1記載のsinA分子。

【請求項7】

前記化学的に修飾されたヌクレオチドがホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む、請求項1記載のsinA分子。

【請求項8】

前記非ヌクレオチドが無塩基成分を含む、請求項1記載のsinA分子。

【請求項9】

前記無塩基成分が反転デオキシ無塩基成分を含む、請求項8記載のsinA分子。

【請求項10】

前記非ヌクレオチドがグリセリル成分を含む、請求項1記載のsinA分子。

【請求項11】

sinA分子の各鎖が19-23ヌクレオチドを含み、各鎖が他方の鎖のヌクレオチドと相補的な少なくとも19ヌクレオチドを含む、請求項1記載のsinA分子。

【請求項12】

前記sinA分子が2つの別々のオリゴヌクレオチドフラグメントから組み立てられており、一方のフラグメントは前記sinA分子のセンス領域を含み、第2のフラグメントは前記sinA分子のアンチセンス領域を含む、請求項1記載のsinA分子。

【請求項13】

前記センス領域がリンカー分子を介してアンチセンス領域に連結されている、請求項1記載のsinA分子。

【請求項14】

前記リンカー分子がポリヌクレオチドリンカーである、請求項13記載のsinA分子。

【請求項15】

前記リンカー分子が非ヌクレオチドリンカーである、請求項13記載のsinA分子。

【請求項16】

センス領域中のピリミジンヌクレオチドが2'-オームチルピリミジンヌクレオチドである、請求項1記載のsinA分子。

【請求項17】

センス領域中のプリンヌクレオチドが2'-デオキシプリンヌクレオチドである、請求項1記載のsinA分子。

【請求項18】

センス領域中に存在するピリミジンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドである、請求項1記載のsinA分子。

【請求項19】

前記センス領域を含むフラグメントが、前記センス領域を含むフラグメントの5'末端、3'末端、または5'末端および3'末端の両方に末端キャップ成分を含む、請求項12記載のsinA分子。

【請求項20】

前記末端キャップ成分が反転デオキシ無塩基成分である、請求項19記載のsinA分子。

【請求項21】

前記アンチセンス領域のピリミジンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドである、請求項1記載のsinA分子。

【請求項22】

前記アンチセンス領域のプリンヌクレオチドが2'-オームチルプリンヌクレオチドである、請求項1記載のsinA分子。

【請求項23】

前記アンチセンス領域中に存在するプリンヌクレオチドが2'-デオキシ-プリンヌクレオチドを含む、請求項1記載のsinA分子。

【請求項24】

前記アンチセンス領域が前記アンチセンス領域の3'末端にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む、請求項21記載のsinA分子。

【請求項25】

前記アンチセンス領域が前記アンチセンス領域の3'末端にグリセリル修飾を含む、請求項1記載のs i n a分子。

【請求項26】

前記s i n a分子の2つのフラグメントのそれぞれが2 i s k l e o tを含む、請求項12記載のs i n a分子。

【請求項27】

s i n a分子の各フラグメントの約19ヌクレオチドはs i n a分子の他方のフラグメントの相補的ヌクレオチドと塩基対形成し、s i n a分子の各フラグメントの少なくとも2つの3'末端ヌクレオチドはs i n a分子の他方のフラグメントのヌクレオチドと塩基対形成しない、請求項26記載のs i n a分子。

【請求項28】

s i n a分子の各フラグメントの2つの3'末端ヌクレオチドのそれぞれが2'-デオキシ-2'-ヒンジンである、請求項27記載のs i n a分子。

【請求項29】

前記2'-デオキシ-2'-ヒンジンが2'-デオキシ-2'-ヒンジンである、請求項28記載のs i n a分子。

【請求項30】

s i n a分子の各フラグメントの2 i s k l e o tのすべてがs i n a分子の他方のフラグメントの相補的ヌクレオチドと塩基対形成する、請求項26記載のs i n a分子。

【請求項31】

アンチセンス領域の19ヌクレオチドがH I V遺伝子またはその一部によりコードされるR N Aのヌクレオチド配列と塩基対形成する、請求項26記載のs i n a分子。

【請求項32】

アンチセンス領域の2 i s k l e o tがH I V遺伝子またはその一部によりコードされるR N Aのヌクレオチド配列と塩基対形成する、請求項26記載のs i n a分子。

【請求項33】

前記アンチセンス領域を含むフラグメントの5'末端が任意にリン酸基を含む、請求項12記載のs i n a分子。

【請求項34】

H I V R N AがH I V-1 R N Aを含む、請求項1記載のs i n a分子。

【請求項35】

許容可能な担体または希釈剤中に請求項1記載のs i n a分子を含む医薬組成物。